



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) PI 0713730-3 A2



(22) Data de Depósito: 22/06/2007
(43) Data da Publicação: 30/10/2012
(RPI 2182)

(51) Int.Cl.:
A61K 31/553
A61K 45/06
A61P 35/02

(54) Título: COMBINAÇÕES COMPREENDENDO ESTAUROSPORINAS

(30) Prioridade Unionista: 23/06/2006 GB 0612542.1

(73) Titular(es): Novartis Ag

(72) Inventor(es): Peter Valent

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT EP2007005517 de 22/06/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/147613de 27/12/2007

(57) Resumo: COMBINAÇÕES COMPREENDENDO ESTAUROSPORINAS. A presente invenção refere-se a um método de tratamento de síndromes mielodisplásicas, linfomas e leucemias e também tumores sólidos com uma combinação farmacêutica de um inibidor de quinase FLT-3 e a um oligonucleotídeo antissenso ou a um constructo de RNAi mcl-1-específico. Ele também se refere ao uso de uma combinação farmacêutica de um inibidor de deacetilase de histona e um inibidor de quinase FLT-3 para o tratamento das doenças ou malignidades mencionadas acima e ao uso de tal composição farmacêutica para a fabricação de um medicamento para o tratamento dessas doenças ou malignidades.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "COMBINAÇÕES COMPREENDENDO ESTAUROSPORINAS".

A presente invenção refere-se a um método de tratamento de síndromes mielodisplásicas, linfomas e leucemias, em particular mastocitose sistêmica (SM) e também leucemia mielóide aguda (AML) e tumores sólidos tais como, por exemplo, câncer cólon-retal (CRC) e câncer de pulmão de células não-pequenas (NSCLC) com uma combinação farmacêutica de um inibidor de quinase FLT-3 e um inibidor de MCL-1, tal como uma estrutura de ácido nucleico mcl-1-específica. Um constructo de ácido nucleico mcl-1-específica inclui, mas não está limitada a, um oligonucleotídeo de mcl-1 antissenso ou uma estrutura de RNAi mcl-1-específica. Um constructo de RNAi mcl-1-específica inclui, mas não está limitada a, uma estrutura de RNA de interferência curto (siRNA), um micro RNA (miRNA) ou um RNA de hairpina (shRNA). A invenção também se refere ao uso de uma combinação farmacêutica de oligonucleotídeo antissenso ou um RNAi mcl-1-específico e um inibidor de quinase FLT-3 para o tratamento das doenças ou malignidades mencionadas acima e o uso de tal composição farmacêutica para a fabricação de um medicamento para o tratamento dessas doenças ou malignidades.

20 Mastocitose é um termo coletivo usado para um grupo de distúrbios caracterizado por acúmulo anormal de mastócitos (MC) em um ou mais sistemas de órgão. Variantes cutânea e sistêmica da doença foram descritas. Mastocitose cutânea (CM) se desenvolve, tipicamente, no início da infância e mostra um curso benigno, com frequente regressão espontânea.

25 Mastocitose sistêmica (SM) pode se desenvolver em qualquer idade e é caracterizada por envolvimento de um ou mais órgãos viscerais com ou sem envolvimento da pele. Em contraste à CM, a SM é um distúrbio clonal persistente de MC. Em uma alta proporção dos casos, a mutação de transformação D816V de KIT é detectável. Em SM avançada, a mutação também pode ser detectável em outras linhagens mieloides ou mesmo em linfócitos B. Assim, a SM é uma doença de progenitores hematopoiéticos multilinhagem. O conceito de que a SM surge de um progenitor multilinhagem é também sus-

tentado pela noção de que esses pacientes podem desenvolver uma doença hematológica que não da linhagem de mastócitos associada (AHNMD).

A classificação de consenso da OMS define quatro categorias de SM: mastocitose sistêmica indolente (ISM), mastocitose com AHNMD (SM-5 AHNMD), SM agressiva (ASM) e leucemia de mastócitos (MCL). Variantes de SM diferem umas das outras quanto a seu comportamento clínico e prognóstico e usualmente requer diferentes terapias. Notavelmente, em contraste à ISM, pacientes com ASM ou MCL são candidatos para tratamento com fármacos citorreduktivos ou objetivados.

10 Até o momento, apenas uns poucos fármacos, tais como interferon-alfa (IFN α) ou cladribina (2CdA), foram descritos como suprimindo o crescimento de MC neoplásico em ASM ou MCL e apenas uns poucos pacientes mostram respostas grandes e duráveis. Alguns dos novos inibidores de quinase de tirosina (TK), tal como N-[(9S,10R, 11R, 13R)-2,3,10,11,12,13-hexahidro-10-metóxi-9-metil-1-oxo-9,13-epóxi-1H,9H-di-15 indolo[1,2,3-gh:3',2',1'-im]pirrolo[3,4-j][1,7]benzodiazonin-11-il]-N-metilbenzamida ou nilotinib (4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-N-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)fenil] benzamida), podem também contra- atuar o crescimento de MC neoplásico. Novamente, contudo, respostas de longa duração ainda têm de ser descritas. Outros estudos sugerem que o imatinib inibe o crescimento de MC neoplásico em pacientes com SM. Contudo, o efeito do imatinib é observado apenas em pacientes cujo MC neoplásico abrigando KIT do tipo silvestre, a mutação F522C de KIT ou em pacientes que têm eosinofilia co-existente associada ao gene de fusão 20 FIP1L1/PDGFR α . Em contraste, o imatinib mostra pouco, se algum, efeito sobre MC neoplásico exibindo D816V em KIT. Na verdade, essa mutação em KIT, a qual é detectável na maioria dos pacientes com SM, confere resistência contra o imatinib.

Uma série de tentativas foi feita recentemente para identificar 30 novos alvos em MC neoplásico de forma a desenvolver abordagens terapêuticas mais eficazes e combinações de fármaco mais eficazes. Uma abordagem promissora pode ser investigar moléculas relacionadas à sobrevivência

que são expressas em MC em neoplasmas de MC de alto grau (ASM, MCL).

Mcl-1 é um membro bem caracterizado da família Bcl-2 que é considerado como atuando anti-apoptoticamente em várias células neoplásicas. Veja, por exemplo, Mendelian Inheritance in Man, MIM accno. 159552.

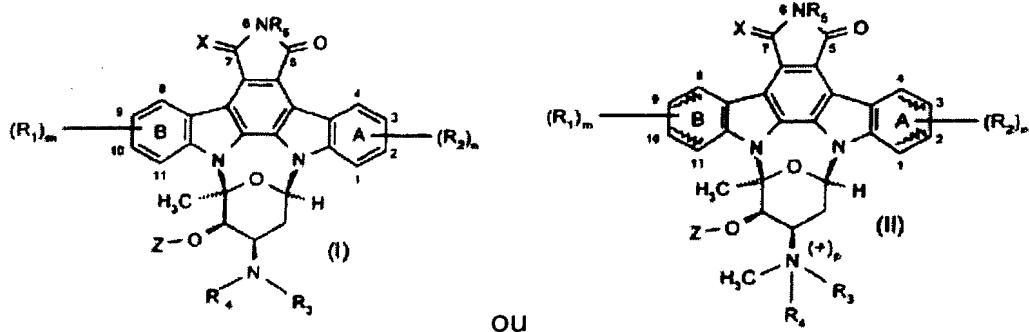
- 5 Originalmente, a Mcl-1 foi descrita como uma molécula de intensificação de sobrevivência, expressa durante diferenciação TPA-induzida de células ML-1 leucêmicas. Estudos consecutivos mostram que a Mcl-1 é constitutivamente expressa em células neoplásicas primárias em leucemia mielóide crônica. Contudo, pouco se sabe até o momento sobre a expressão e papel da Mcl-1
10 em outros neoplasmas mieloides.

Até agora, descobriu-se que inibidores de quinase FLT-3 em combinação com um oligonucleotídeo antissenso ou um constructo de RNAi mcl-1-específica possui propriedades terapêuticas. Essas descobertas tornam a combinação de um inibidor de quinase FLT-3 e um inibidor de mcl-1
15 como particularmente útil para o tratamento de síndromes mielodisplásicas, linfomas e leucemias, em particular mastocitose sistêmica e também leucemia mielóide (AML) e também tumores sólidos tais como, por exemplo, câncer cólon-retal (CRC) e câncer de pulmão de células não-pequenas (NS-CLC).

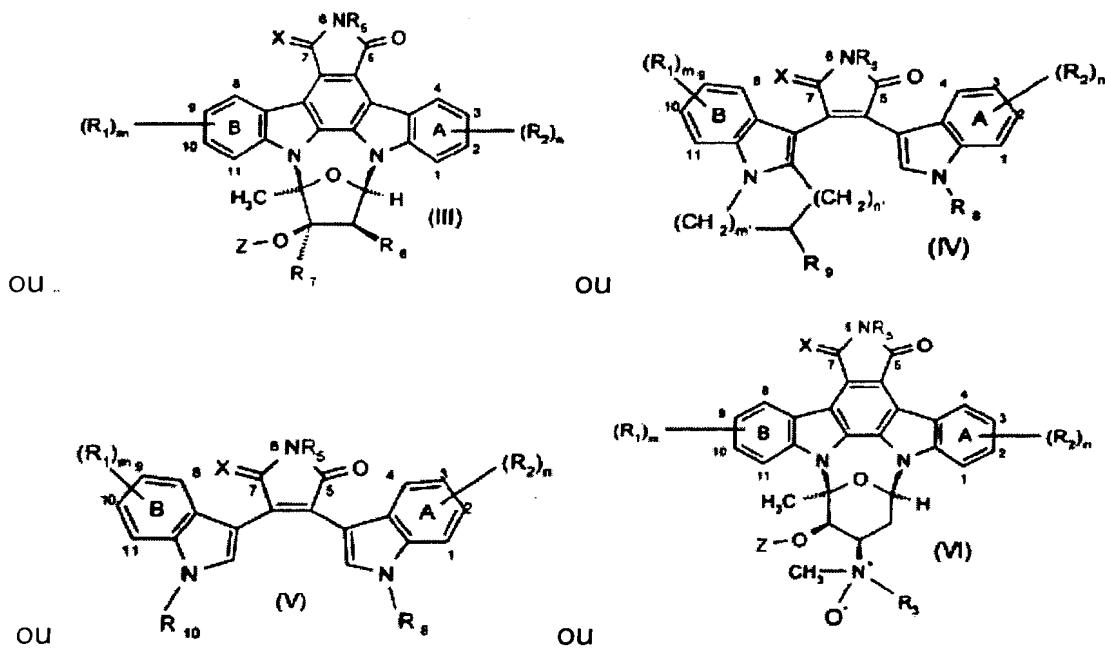
20 Em particular, descobriu-se agora que MC neoplásico primário em todas as variantes de SM, incluindo ASM e MCL, bem como a linhagem de célula de MCL HMC-1, expressa Mcl-1 de uma maneira constitutiva. Além disso, objetivação de Mcl-1 nessas células está associada a crescimento reduzido e indução de apoptose e a uma sensibilidade aumentada a inibidores de TK, incluindo N-[^{9S,10R, 11R, 13R}-2,3,10,11,12,13-hexahidro-10-metóxi-9-metil-1-oxo-9,13-epóxi-1H,9H-di-indolo[1,2,3-gh:3',2',1'-im]pirrolo[3,4-j][1,7]benzodiazonin-11-il]-N-metilbenzamida, 4-metil-3-[^{4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-N-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)fenil] benzamida e imatinib.}

25 Inibidores de quinase FLT-3 de interesse particular para uso na combinação da invenção são 4-metil-3-[^{4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-N-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)fenil] benzamida e imatinib e de-}

rivados de estaurosponina de fórmula:



em que (II) é o derivado parcialmente hidrogenado do composto (I):



em que:

- 5 R_1 e R_2 são, independentemente um do outro, alquila não-substituída ou substituída, hidrogênio, halogênio, hidróxi, hidróxi eterificado ou esterificado, amino, amino mono- ou dissubstituído, ciano, nitro, mercapto, mercapto substituído, carbóxi, carbóxi esterificado, carbamoila, carbamoíla N-mono- ou N,N-dissubstituída, sulfo, sulfonila substituída, amino-sulfonila ou amino-sulfonila N-mono- ou N,N-dissubstituída;

10 n e m são, independentemente um do outro, um número de e incluindo 0 a e incluindo 4;

n' e m' são, independentemente um do outro, um número de e

incluso 0 a e inclusivo 4;

R_3 , R_4 , R_8 e R_{10} são, independentemente um do outro, hidrogênio, -O, acila com até 30 átomos de carbono, um radical alifático, carbocíclico ou carbocíclico-alifático com até 29 átomos de carbono em cada caso, um radical heterocíclico ou heterocíclico-alifático com até 20 átomos de carbono em cada

5 caso e, em cada caso, até 9 heteroátomos, uma acila com até 30 átomos de carbono, em que R_4 pode também estar ausente;

ou, se R_3 é acila com até 30 átomos de carbono, R_4 não é uma
10 acila;

p é 0 se R_4 está ausente ou é 1 se R_3 e R_4 estão ambos presentes e, em cada caso, são um dos radicais antes mencionados;

R_5 é hidrogênio, um radical alifático, carbocíclico ou carbocíclico-alifático com até 29 átomos de carbono em cada caso ou um radical heterocíclico ou heterocíclico-alifático com até 20 átomos de carbono em cada caso e, em cada caso, até 9 heteroátomos ou acila com até 30 átomos de carbono;

R_7 , R_6 e R_9 são acila ou -(alquila inferior)-acila, alquila não-substituída ou substituída, hidrogênio, halogênio, hidróxi, hidróxi eterificado
20 ou esterificado, amino, amino mono- ou dissustituído, ciano, nitro, mercapto, mercapto substituído, carbóxi, carbonila, carbonildíoxi, carbóxi esterificado, carbamoíla, carbamoíla N-mono- ou N,N-dissustituída, sulfo, sulfonila substituída, amino-sulfonila ou amino-sulfonila N-mono- ou N,N-dissustituída;

25 X significa 2 átomos de hidrogênio; 1 átomo de hidrogênio e hidróxi; O; ou hidrogênio e alcóxi inferior;

Z significa hidrogênio ou alquila inferior; e

as duas ligações caracterizadas por linhas onduladas estão ausentes no anel A e são substituídas por 4 átomos de hidrogênio e as duas
30 linhas onduladas no anel B cada, junto com a respectiva ligação paralela, significam uma ligação dupla;

ou as duas ligações caracterizadas por linhas onduladas estão

ausentes no anel B e são substituídas por um total de 4 átomos de hidrogênio e as duas linhas onduladas no anel A cada, junto com a respectiva ligação paralela, significam uma ligação dupla;

- ou no anel A e no anel B, todas as 4 ligações onduladas estão ausentes e são substituídas por um total de 8 átomos de hidrogênio;
- ou um sal do mesmo, se pelo menos um grupo de formação de sal está presente.

Os termos gerais e definições usados aqui antes e aqui depois têm, de preferência, os significados a seguir para os derivados de estauros-
porina.

O prefixo "inferior" indica que o radical associado tem, de preferência, até e incluindo um máximo de 7 átomos de carbono, especialmente até e incluindo um máximo de 4 átomos de carbono.

Alquila inferior é, especialmente, metila, etila, n-propila, isopropila, n-butila, isobutila, sec-butila ou terc-butila e também pentila, hexila ou heptila.

Alquila não-substituída ou substituída é, de preferência, C₁-C₂₀ alquila, especialmente alquila inferior, tipicamente metila, etila, n-propila, isopropila, n-butila, isobutila, sec-butila ou terc-butila, a qual é não-substituída ou substituída especialmente por halogênio, tal como flúor, cloro, bromo ou iodo, C₆-C₁₄ arila, tal como fenila ou naftila, hidróxi, hidróxi eterificado, tal como alcóxi inferior, fenil-alcóxi inferior ou fenilóxi, hidróxi esterificado, tal como alcanoilóxi inferior ou benzoilóxi, amino, amino mono- ou dissubstituído, tal como alquilamino inferior, alcanoilamino inferior, fenil-alquilamino inferior, N,N-di-alquilamino inferior, N,N-di-(fenil-alquil)amino inferior, ciano, mercapto, mercapto substituído, tal como alquiltio inferior, carbóxi, carbóxi esterificado, tal como alcóxicarbonila inferior, carbamoíla, Carbamoíla N-mono- ou N,N-dissubstituída, tal como N-alquilcarbamoaíla inferior ou N,N-di-alquilcarbamoaíla inferior, sulfo, sulfo substituído, tal como alcano-sulfonila inferior ou alcóxi-sulfonila inferior, amino-sulfonila ou Amino-sulfonila N-mono- ou N,N-dissubstituída, tal como N-alquilamino-sulfonila inferior ou N,N-di-alquilamino-sulfonila inferior.

Halogênio é, de preferência, flúor, cloro, bromo ou iodo, especialmente flúor ou cloro.

Hidróxi esterificado é especialmente alcóxi inferior, C₆-C₁₄arilóxi, tal como fenilóxi ou C₆-C₁₄aril-alcóxi inferior, tal como benzilóxi.

5 Hidróxi esterificado é, de preferência, alcanoilóxi inferior ou C₆-C₁₄arilcarbonilóxi, tal como benzoilóxi.

Amino mono- ou dissubstituído é especialmente amino monosubstituído ou dissubstituído por alquila inferior, C₆-C₁₄arila, C₆-C₁₄aril-alquila inferior, alcanoíla inferior ou C₆-C₁₂arilcarbonila.

10 Mercapto substituído é especialmente alquiltio inferior, C₆-C₁₄ariltio, C₆-C₁₄aril-alquiltio inferior, alcanoiltio inferior ou C₆-C₁₄aril-alcanoiltio inferior.

Carbóxi esterificado é especialmente alcóxicarbonila inferior, C₆-C₁₄aril-alcóxi carbonila inferior ou C₆-C₁₄arilóxicarbonila.

15 Carbamoíla N-mono- ou N,N-dissubstituída é especialmente carbamoíla N-monossubstituída ou N,N-dissubstituída por alquila inferior, C₆-C₁₄arila ou C₆-C₁₄aril-alquila inferior.

20 Sulfonila substituída é especialmente C₆-C₁₄aril-sulfonila, tal como tolueno-sulfonila, C₆-C₁₄aril-alcano-sulfonila inferior ou alcano-sulfonila inferior.

Amino-sulfonila N-mono- ou N,N-dissubstituída é especialmente amino-sulfonila N-monossubstituída ou N,N-dissubstituída por alquila inferior, C₆-C₁₄arila ou C₆-C₁₄aril-alquila inferior.

25 C₆-C₁₄Arila é um radical arila com 6 a 14 átomos de carbono no sistema de anel, tal como fenila, naftila, fluorenila ou indenila, o qual é não-substituído ou substituído, especialmente por halogênio, tal como flúor, cloro, bromo ou iodo, fenila ou naftila, hidróxi, alcóxi inferior, fenil-alcóxi inferior, fenilóxi, alcanoilóxi inferior, benzoilóxi, amino, alquilamino inferior, alcanoila-mino inferior, fenil-alquilamino inferior, N,N-di-alquilamino inferior, N,N-di-(fenil-alquil)amino inferior, ciano, mercapto, alquiltio inferior, carbóxi, alcóxi-carbonila inferior, carbamoíla, N-alquilcarbamoaíla inferior, N,N-di-alquilcarbamoaíla inferior, sulfo, alcano-sulfonila inferior, alcóxi sulfonila inferi-

or, amino-sulfonila, N-alquilamino sulfonila inferior ou N,N-di-alquilamino-sulfonila inferior.

Os índices n e m são, em cada caso, de preferência 1, 2 ou especialmente 0. Em geral, compostos de fórmula I nos quais n e m são, em 5 cada caso, 0 (zero) são especialmente preferidos.

Um radical carboidrato alifático R₃, R₄, R₈ ou R₁₀ com até 29 átomos de carbono, o qual é substituído por substituintes acíclicos e, de preferência, tem um máximo de 18, especialmente um máximo de 12 e, como uma regra, não mais do que 7 átomos de carbono, pode ser saturado ou insaturado e é especialmente um radical alquila inferior de cadeia reta ou ramificada não-substituída, alquenila inferior, alcadienila inferior ou alquinila inferior substituído por substituintes acíclicos. Alquila inferior é, por exemplo, metila, etila, n-propila, isopropila, n-butila, isobutila, sec-butila ou terc-butila e também n-pentila, isopentila, n-hexila, isohexila e n-heptila; alquenila inferior 10 é, por exemplo, alila, propenila, isopropenila, 2- ou 3-metalila e 2- ou 3-butenila; alcadienila inferior é, por exemplo, 1-penta-2,4-dienila; alquinila inferior é, por exemplo, propargila ou 2-butinila. Em radicais insaturados correspondentes, a ligação dupla está especialmente localizada em uma posição superior à posição α com relação à valência livre. Substituintes são especialmente os radicais acila definidos aqui abaixo como substituintes de R°, 15 de preferência livres ou carbóxi esterificado, tal como carbóxi ou alcóxicarbonila inferior, ciano ou di-alquilamino inferior.

Um radical carbocíclico ou carbocílico-alifático R₃, R₄, R₈ ou R₁₀ com até 29 átomos de carbono, em cada caso, é especialmente um radical 20 aromático, cicloalifático, cicloalifático-alifático ou aromático-alifático o qual está presente na forma não-substituída ou substituída por radicais referidos aqui abaixo como substituintes de R°. Um radical aromático (radical arila) R₃ ou R₄ é, mais especialmente, uma fenila, também uma naftila, tal como 1- ou 2-naftila, uma bifenilila, tal como especialmente 4-bifenilila e também uma 30 antrila, fluorenila e azulenila, bem como seus análogos aromáticos com um ou mais anéis saturados, o qual está presente na forma não-substituída ou substituída por radicais referidos aqui abaixo como substituintes de R°. Ra-

dicais aromáticos-alifáticos preferidos são radicais aril-alquila inferior e aril-alquenila inferior, por exemplo, fenil-alquila inferior ou fenil-alquenila inferior com um radical fenila terminal tal como, por exemplo, benzila, fenetila, 1-, 2- ou 3-fenilpropila, difenilmetila (benzidrila), tritila e cinamila e também 1- ou 2-naftilmetila. Dos radicais arila trazendo radicais acíclicos, tal como alquila inferior, menção especial é feita de radicais o-, m- e p-tolila e xilila com radicais metila variadamente localizados.

Um radical cicloalifático R_3 , R_4 , R_8 ou R_{10} com até 29 átomos de carbono é especialmente um radical cicloalquila, cicloalquenila ou cicloalca-dienila mono-, bi- ou policíclico substituído, de preferência não-substituído. Preferência é por radicais com um máximo de 14, especialmente 12 átomos de carbono no anel e 3 a 8, de preferência 5 a 7 e, mais especialmente, 6 elementos no anel, os quais também podem trazer um ou dois, por exemplo, dois radicais hidrocarboneto alifático, por exemplo, aqueles mencionados acima, especialmente os radicais alquila inferior ou outros radicais cicloalifáticos como substituintes. Substituintes preferidos são os substituintes acílicos mencionados aqui abaixo para R° .

Um radical cicloalifático-alifático R_3 , R_4 , R_8 ou R_{10} com até 29 átomos de carbono é um radical no qual um radical acíclico, especialmente um com um máximo de 7, de preferência um máximo de 4 átomos de carbono, tal como especialmente metila, etila e vinila, traz um ou mais radicais cicloalifáticos conforme definido aqui acima. Menção especial é feita de radicais cicloalquil-alquila inferior, bem como seus análogos os quais são insaturados no anel e/ou na cadeia, mas são não aromáticos e os quais trazem o anel em um átomo de carbono terminal da cadeia. Substituintes preferidos são os substituintes acílicos mencionados aqui abaixo para R° .

Radicais heterocíclicos R_3 , R_4 , R_8 ou R_{10} com até 20 átomos de carbono cada e até 9 heteroátomos cada são, especialmente, radicais monocíclicos, mas também bi- ou policíclicos aza-, tia-, oxa-, tiazza-, oxaza-, diaza-, triaza- ou tetrazacíclicos de um caráter aromático, bem como radicais heterocíclicos correspondentes desse tipo os quais são parcial ou, mais especialmente, totalmente

saturados, esses radicais - se necessário - possivelmente trazendo outros radicais acíclicos, carbocíclicos ou heterocíclicos e/ou, possivelmente, mono-, di- ou polissubstituídos por grupos funcionais, de preferência aqueles mencionados aqui acima, como substituintes de radicais hidrocarboneto alifático.

- 5 Mais especialmente, eles são radicais monocíclicos não-substituídos ou substituídos por um átomo de nitrogênio, oxigênio ou enxofre, tal como 2-aziridinila e, especialmente, radicais aromáticos desse tipo, tais como pírrila, por exemplo, 2-pírrila ou 3-pírrila, piridila, por exemplo, 2-, 3- ou 4-piridila e também tienila, por exemplo, 2- ou 3-tienila ou furila, por exemplo, 2-furila;
- 10 radicais bicíclicos análogos com um átomo de oxigênio, enxofre ou nitrogênio são, por exemplo, indolila, tipicamente 2- ou 3-indolila, quinolila, tipicamente 2- ou 4-quinolila, isoquinolila, tipicamente 3- ou 5-isoquinolila, benzofuranila, tipicamente 2-benzofuranila, cromenila, tipicamente 3-cromenila ou benzotienila, tipicamente 2- ou 3-benzotienila; radicais monocíclicos e bicíclicos preferidos com vários heteroátomos são, por exemplo, imidazolila, tipicamente 2- ou 4-imidazolila, pirimidinila, tipicamente 2- ou 4-pirimidinila, oxazolila, tipicamente 2-oxazolila, isoxazolila, tipicamente 3-isoxazolila ou tiazolila, tipicamente 2-tiazolila e benzimidazolila, tipicamente 2-benzimidazolila, benzoxazolila, tipicamente 2-benzoxazolila ou quinazolila,
- 15 tipicamente 2-quinazolinila. Radicais análogos parcial ou especialmente, completamente saturados apropriados podem também ser considerados, tais como radicais 2-tetrahidrofurila, 2- ou 3-pirrolidinila, 2-, 3- ou 4-piperidila e também 2- ou 3-morfolinila, 2- ou 3-tiomorfolinila, 2-piperazinila e N-mono- ou N,N'-bis-alquila inferior-2-piperazinila. Esses radicais também podem trazer um ou mais radicais acíclicos, carbocíclicos ou heterocíclicos, especialmente aqueles mencionados acima. A valência livre dos radicais heterocíclicos R₃ ou R₄ deve emanar de um de seus átomos de carbono. Heterociclila pode ser não-substituída ou substituída por um ou mais, de preferência um ou dois, dos substituintes mencionados aqui abaixo para R°.
- 20 Radicais heterocíclicos-alifáticos R₃, R₄, R₈ ou R₁₀, especialmente radicais alquila inferior,
- 25 especialmente com um máximo de 7, de preferência um máximo de 4 áto-

mos de carbono, por exemplo, aqueles mencionados aqui acima, os quais trazem um, dois ou mais radicais heterocíclicos, por exemplo, aqueles mencionados no parágrafo precedente, o anel heterocíclico possivelmente sendo ligado à cadeia alifática também através de um de seus átomos de nitrogênio. Um radical heterocíclico-alifático R₁ referido é, por exemplo, imidazol-1-ilmetila, 4-metilpiperazin-1-ilmetila, piperazin-1-ilmetila, 2-(morfolin-4-il)etila e também pirid-3-ilmetila. Heterociclila pode ser não-substituída ou substituída por um ou mais, de preferência um ou dois, dos substituintes mencionados aqui abaixo para R°.

Um radical heteroalifático R₃, R₄, R₈ ou R₁₀ com até 20 átomos de carbono cada e até 10

heteroátomos cada é um radical alifático o qual, ao invés de um, dois ou mais átomos de carbono, contém heteroátomos idênticos ou diferentes tais como, especialmente, oxigênio, enxofre e nitrogênio. Uma disposição especialmente preferida de um radical heteroalifático R₁ toma a forma de radicais oxa-alquila nos quais um ou mais átomos de carbono são substituídos, de preferência, em uma alquila linear, por átomos de oxigênio, de preferência, separados uns dos outros por vários (especialmente 2) átomos de carbono, de modo que eles formam um grupo de repetição, se necessário, um grupo de multirrepetição (O-CH₂-CH₂-)_q, em que q = 1 a 7.

Especialmente preferidos como R₃, R₄, R₈ ou R₁₀, além de acila, são alquila inferior, particularmente metila ou etil; alcóxicarbonil-alquila inferior, especialmente metóxicarbonilmetila ou 2-(terc-butóxicarbonil)etila; carbóxi-alquila inferior, especialmente carbóximetila ou 2-carbóxietila; ou ciano-alquila inferior, especialmente 2-cianoetila.

Um radical acila R₃, R₄, R₆, R₇, R₈, R₉ ou R₁₀ com até 30 átomos de carbono deriva de um ácido carboxílico, funcionalmente modificado se necessário, um ácido sulfônico orgânico ou um ácido fosfórico, tal como ácido piro- ou ortofosfórico, se necessário.

Uma acila designada Ac' e derivada de um ácido carboxílico, funcionalmente modificada se necessário é, especialmente, uma da subfórmula Y-C(=W)-, em que W é oxigênio, enxofre ou imino e Y é hidrogênio,

hidrocarbila R° com até 29 átomos de carbono, hidrocarbilóxi R°-O-, um grupo amino ou um grupo amino substituído, especialmente uma da fórmula R°HN- ou R°R°N- (em que os radicais R° podem ser idênticos ou diferentes uns dos outros).

- 5 Hidrocarbila (radical hidrocarboneto) R° é um radical hidrocarboneto acíclico (alifático), carbocíclico ou carbocíclico-acíclico, com até 29 átomos de carbono cada, especialmente até 18 e, de preferência, até 12 átomos de carbono e é saturado ou insaturado, não-substituído ou substituído. Ao invés de um, dois ou mais átomos de carbono, ele pode conter heteroátomos 10 idênticos ou diferentes tais como, especialmente, oxigênio, enxofre e nitrogênio na parte acíclica e/ou cíclica; no último caso, ele é descrito como um radical heterocíclico (radical heterocíclila) ou um radical heterocíclico-acíclico.

- 15 Radicais insaturados são aqueles os quais contêm uma ou mais, especialmente ligações múltiplas isoladas e/ou conjugadas (ligações duplas ou triplas). O termo radicais cíclicos também inclui radicais aromáticos e não aromáticos com ligações duplas conjugadas, por exemplo, aqueles em que pelo menos um anel carbocíclico com 6 elementos ou heterocíclico com 5 a 8 elementos contém o número máximo de ligações duplas não cumulativas.
- 20 Radicais carbocíclicos, em que pelo menos um anel está presente como um anel aromático de 6 elementos (isto é, anel de benzeno) são definidos como radicais arila.

- 25 Um radical hidrocarboneto acíclico não-substituído R° é, especialmente, um radical alquila inferior de cadeia reta ou ramificada, alquenila inferior, alcadienila inferior ou alquinila inferior radical. Alquila inferior R° é, por exemplo, metila, etila, n-propila, isopropila, n-butila, isobutila, sec-butila ou terc-butila e também n-pentila, isopentila, n-hexila, isoheptila e n-heptila; alquenila inferior é, por exemplo, alila, propenila, isopropenila, 2- ou 3-metilila e 2- ou 3-butenila; alcadienila inferior é, por exemplo, 1-penta-2,4-dienila; alquinila inferior é, por exemplo, propargila ou 2-butinila. Em radicais insaturados correspondentes, a ligação dupla está, especialmente, localizada em uma posição superior que não a posição α com relação à valência

livre.

Um radical hidrocarboneto carbocíclico R° é, especialmente, um radical cicloalquila, cicloalquenila ou cicloalcadienila mono-, bi- ou policíclico ou um radical arila correspondente. Preferência é por radicais com um máximo de 14, especialmente 12, átomos de carbono no anel e 3 a 8, de preferência 5 a 7 e, mais especialmente, 6 elementos no anel o qual também pode trazer um ou mais, por exemplo, dois radicais acíclicos, por exemplo, aqueles mencionados acima, especialmente os radicais alquila inferior ou outros radicais carbocíclicos. Radicais carbocíclicos-acíclicos são aqueles nos quais um radical acíclico, especialmente um com um máximo de 7, de preferência um máximo de 4 átomos de carbono tal como, especialmente, metila, etila e vinila, traz um ou mais radicais carbocíclicos, se necessário, da definição acima. Menção especial é feita de radicais cicloalquila inferior e aril-alquila inferior, bem como seus análogos os quais são insaturados no anel e/ou na cadeia e os quais trazem o anel no átomo de carbono terminal da cadeia.

Cicloalquila R° tem, mais especialmente, de 3 até e incluindo 10 átomos de carbono e é, por exemplo, ciclopropila, ciclobutila, ciclopentila, ciclohexila, cicloheptila e ciclooctila, bem como biciclo[2.2.2]octila, 2-biciclo[2.2.1]heptila e adamantila, a qual também pode ser substituída por 1, 2 ou mais, por exemplo, radicais alquila inferior, especialmente radicais metila; cicloalquenila é, por exemplo, um dos radicais cicloalquila monocíclicos já mencionados o qual traz uma ligação dupla na posição 1-, 2- ou 3. Cicloalquil-alquila inferior ou -alquenila inferior é, por exemplo, uma -metila, -1- ou -2-etila, -1- ou -2-vinila, -1-, -2- ou -3-propila ou -alila substituída por um dos radicais cicloalquila mencionados acima, aqueles substituídos na extremidade da cadeia linear sendo preferidos.

Um radical arila R° é, mais especialmente, uma fenila, também uma naftila, tal como 1- ou 2-naftila, uma bifenilila tal como, especialmente, 4-bifenilila e também uma antrila, fluorenila e azulenila, bem como seus análogos aromáticos com um ou mais anéis saturados. Radicais aril-alquila inferior e -alquenila inferior preferidos são, por exemplo, fenil-alquila inferior ou

fenil-alquenila inferior com um radical fenila terminal tal como, por exemplo, benzila, fenetila, 1-, 2- ou 3-fenilpropila, difenilmetila (benzidrila), tritila e cinnamila e também 1- ou 2-naftilmetila. Arila pode ser não-substituída ou substituída.

- 5 Radicais heterocíclicos, incluindo radicais heterocíclicos-acíclicos, são especialmente radicais aza-, tia-, oxa-, tiazza-, oxaza-, diaza-, triaza- ou tetrazacíclicos monocíclicos, mas também bi- ou policíclicos, de um caráter aromático, bem como radicais heterocíclicos correspondentes desse tipo os quais são parcialmente ou, mais especialmente, totalmente 10 saturados; se necessário, por exemplo, conforme no caso dos radicais carbocíclicos ou arila mencionados acima, esses radicais podem trazer radicais acíclicos, carbocíclicos ou heterocíclicos e/ou podem ser mono-, di- ou polisubstituídos por grupos funcionais. A parte acíclica nos radicais heterocíclicos-acíclicos tem, por exemplo, o significado indicado para os radicais carbocíclicos-acíclicos correspondentes. Mais especialmente, eles são radicais monocíclicos não-substituídos ou substituídos por um átomo de nitrogênio, oxigênio ou enxofre, tal como 2-aziridinila e, especialmente, radicais aromáticos desse tipo, tais como pirrolila, por exemplo, 2-pirrolila ou 3-pirrolila, piridila, por exemplo, 2-, 3- ou 4-piridila e também tienila, por exemplo, 2- ou 3- 15 tienila ou furila, por exemplo, 2-furila; radicais bicíclicos análogos com um átomo de oxigênio, enxofre ou nitrogênio são, por exemplo, indolila, tipicamente 2- ou 3-indolila, quinolila, tipicamente 2- ou 4-quinolila, isoquinolila, tipicamente 3- ou 5-isoquinolila, benzofuranila, tipicamente 2-benzofuranila, cromenila, tipicamente 3-cromenila ou benzotienila, tipicamente 2- ou 3- 20 benzotienila; radicais monocíclicos e bicíclicos preferidos com vários heteroátomos são, por exemplo, imidazolila, tipicamente 2-imidazolila, pirimidinila, tipicamente 2- ou 4-pirimidinila, oxazolila, tipicamente 2-oxazolila, isoxazolila, tipicamente 3-isoxazolila ou tiazolila, tipicamente 2-tiazolila e benzimidazolila, tipicamente 2-benzimidazolila, benzoxazolila, tipicamente 2-benzoxazolila 25 ou quinazolila, tipicamente 2-quinazolinila. Radicais análogos parcial ou, especialmente completamente saturados adequados podem também ser considerados, tais como radicais 2-tetrahidrofurila, 4-tetrahidrofurila, 2- ou 3- 30 ou quinazolila, tipicamente 2-quinazolinila.

pirrolidila, 2-, 3- ou 4-piperidila e também 2- ou 3-morfolinila, 2- ou 3-tiomorfolinila, 2-piperazinila e N,N'-bis-alquil-2-piperazinila inferior. Esses radicais podem também trazer um ou mais radicais acíclicos, carbocíclicos ou heterocíclicos, especialmente aqueles mencionados aqui acima. radicais heterocíclicos-acíclicos são especialmente derivados de radicais acíclicos com um máximo de 7, de preferência um máximo de 4 átomos de carbono, por exemplo, aqueles mencionados aqui acima e podem trazer um, dois ou mais radicais heterocíclicos, por exemplo, aqueles mencionados aqui acima, o anel possivelmente sendo ligado à cadeia alifática também através de um de seus átomos de nitrogênio.

Conforme já mencionado, uma hidrocarbila (incluindo uma heterociclila) pode ser substituída por um, dois ou mais substituintes idênticos ou diferentes (grupos funcionais); um ou mais dos seguintes substituintes podem ser considerados: alquila inferior; grupos hidroxila livres, eterificados e esterificados; grupos carbóxi e grupos carbóxi esterificados; mercapto- e alquiltio inferior e, se necessário, grupos feniltio substituídos; átomos de halogênio, tipicamente cloro e flúor, mas também bromo e iodo; grupos halogenoalquila inferior; grupos oxo os quais estão presentes na forma de grupos formila (isto é, aldeído) e ceto, também como acetais ou cetais correspondentes; grupos azido; grupos nitro; grupos ciano; grupos amino primário, secundário e, de preferência, terciário, amino-alquila inferior, amino-alquila inferior mono- ou dissustituído, grupos amino primário ou secundário protegidos por grupos de proteção convencionais (especialmente alcóxicarbonila inferior, tipicamente terc-butóxicarbonil-alquilenodióxi inferior e também grupos sulfo funcionalmente modificados, tipicamente grupos sulfamoíla ou sulfo presentes na forma livre ou como sais. O radical hidrocarbila pode também trazer grupos carbamoíla, ureido ou guanidino, os quais são livres ou os quais trazem um ou dois substituintes e grupos ciano. O uso acima da palavra "grupos" é tomada para implicar também em um grupo individual.

Halogen-alquila inferior contém, de preferência, 1 a 3 átomos de halogênio; preferida é trifluorometila ou clorometila.

Um grupo hidroxila eterificado presente na hidrocarbila como um

substituinte é, por exemplo, um grupo alcóxi inferior, tipicamente o grupo metóxi-, etóxi-, propóxi-, isopropóxi-, butóxi- e terc-butóxi, o qual pode também ser substituído, especialmente por (i) heterociclila, pelo que a heterociclila pode ter, de preferência, 4 a 12 átomos no anel, pode ser insaturada ou parcial ou totalmente saturada, é mono- ou bicíclica e pode conter até três heteroátomos selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre e é, mais especialmente, pirrolila, por exemplo, 2-pirrolila ou 3-pirrolila, piridila, por exemplo, 2-, 3- ou 4-piridila e também tienila, por exemplo, 2- ou 3-tienila ou furila, por exemplo, 2-furila, indolila, tipicamente 2- ou 3-indolila, quinolila, tipicamente 2- ou 4-quinolila, isoquinolila, tipicamente 3- ou 5-isoquinolila, benzofuranila, tipicamente 2-benzofuranila, cromenila, tipicamente 3-cromenila, benzotienila, tipicamente 2- ou 3-benzotienila; imidazolila, tipicamente 1- ou 2-imidazolila, pirimidinila, tipicamente 2- ou 4-pirimidinila, oxazolila, tipicamente 2-oxazolila, isoxazolila, tipicamente 3-isoxazolila, tiazolila, tipicamente 2-tiazolila, benzimidazolila, tipicamente 2-benzimidazolila, benzoxazolila, tipicamente 2-benzoxazolila, quinazolila, tipicamente 2-quinazolinila, 2-tetrahidrofurila, 4-tetrahidrofuranila, 2- ou 4-tetrahidropiranila, 1-, 2- ou 3-pirrolidila, 1-, 2-, 3- ou 4-piperidila, 1-, 2- ou 3-morfolinila, 2- ou 3-tiomorfolinila, 2-piperazinila ou N,N'-bis-alquila inferior-2-piperazinila; e também (ii) por átomos de halogênio, por exemplo, mono-, di- ou polissubstituída, especialmente na posição 2, conforme no radical 2,2,2-tricloroetóxi, 2-cloroetóxi ou 2-iodoetóxi ou (iii) por hidróxi ou (iv) radicais alcóxi inferior, cada um, de preferência monossubstituído, especialmente na posição 2, conforme no radical 2-metóxietóxi. Tais grupos hidroxila eterificado são também radicais fenóxi não-substituídos ou substituídos e radicais fenil-alcóxi inferior tais como, especialmente, benzilóxi, benzidrilóxi e trifenilmetóxi (tritilóxi), bem como radicais heterociclolíxi, em que a heterociclila pode ter, de preferência, 4 a 12 átomos no anel, pode ser insaturada ou parcial ou totalmente saturada, é mono- ou bicíclica e pode conter até três heteroátomos selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre e é, mais especialmente, pirrolila, por exemplo, 2-pirrolila ou 3-pirrolila, piridila, por exemplo, 2-, 3- ou 4-piridila e também tienila, por exemplo, 2- ou 3-

tienila ou furila, por exemplo, 2-furila, indolila, tipicamente 2- ou 3-indolila, quinolila, tipicamente 2- ou 4-quinolila, isoquinolila, tipicamente 3- ou 5-isoquinolila, benzofuranila, tipicamente 2-benzofuranila, cromenila, tipicamente 3-cromenila, benzotienila, tipicamente 2- ou 3-benzotienila; imidazolila, tipicamente 1- ou 2-imidazolila, pirimidinila, tipicamente 2- ou 4-pirimidinila, oxazolila, tipicamente 2-oxazolila, isoxazolila, tipicamente 3-isoxazolila, tiazolila, tipicamente 2-tiazolila, benzimidazolila, tipicamente 2-benzimidazolila, benzoxazolila, tipicamente 2-benzoxazolila, quinazolila, tipicamente 2-quinazolinila, 2-tetrahidrofurila, 4-tetrahidrofurila, 2- ou 4-tetrahidropiranila, 1-, 2- ou 3-pirrolidila, 1-, 2-, 3- ou 4-piperidila, 1-, 2- ou 3-morfolinila, 2- ou 3-tiomorfolinila, 2-piperazinila ou N,N'-bis-alquil-2-piperazinila inferior; tal como especialmente 2- ou 4-tetrahidropiranilóxi.

Grupos hidroxila eterificados, nesse contexto, são tomados para incluir grupos hidroxila silitada, tipicamente, por exemplo, trialquil-sililóxi inferior, tipicamente trimetil-sililóxi e dimetil-terc-butil-sililóxi ou fenildi-alquil-sililóxi inferior e alquil-difenil-sililóxi inferior.

Um grupo hidroxila esterificado presente na hidrocarbila como um substituinte é, por exemplo, alcanoilóxi inferior.

Um grupo carboxila presente na hidrocarbila, como um substituinte, é um no qual o átomo de hidrogênio é substituído por um dos radicais hidrocarbila caracterizados aqui acima, de preferência um radical alquila inferior ou fenil-alquila inferior; um exemplo de um grupo carboxila esterificado é alcóxicarbonila inferior ou fenil-alcóxicarbonila inferior substituída, se necessário, na parte fenila, especialmente o grupo metóxi, etóxi, terc-butóxi e benzilóxicarbonila, bem como um grupo carboxila lactonizado.

Um grupo amino primário -NH₂, como um substituinte das hidrocarbila, pode também estar presente em uma forma protegida por um grupo de proteção convencional. Um grupo amino secundário traz, ao invés de um dos dois átomos de hidrogênio, um radical hidrocarbila, de preferência um não-substituído, tipicamente um dos acima mencionados, especialmente alquila inferior e pode também estar presente na forma protegida.

Um grupo amino terciário presente na hidrocarbila como um substituinte traz 2 radicais hidrocarbila diferentes ou, de preferência, idênticos (incluindo os radicais heterocíclicos), tais como os radicais hidrocarbila não-substituídos caracterizados aqui acima, especialmente alquila inferior.

- 5 Um grupo amino preferido é um com a fórmula $R_{11}(R_{12})N-$, em que R_{11} e R_{12} são, independentemente em cada caso, hidrogênio, C₁-C₇-hidrocarbila acíclica não-substituída (tal como especialmente C₁-C₄alquila ou C₂-C₄alquenila) ou arila monocíclica, aralquila ou aralquenila substituídas, se necessário, por C₁-C₄-alquila, C₁-C₄-alcóxi, halogênio e/ou nitro e tendo um
- 10 máximo de 10 átomos de carbono, onde os radicais contendo carbono podem ser interligados através de uma ligação carbono-carbono ou um átomo de oxigênio, um átomo de enxofre ou um átomo de nitrogênio substituído, se necessário, por hidrocarbila. Em tal caso, eles formam um anel heterocíclico contendo nitrogênio com o átomo de nitrogênio do grupo amino. Os seguintes são exemplos de grupos amino dissustituídos especialmente preferidos:
- 15 di-alquilamino inferior, tipicamente dimetilamino ou dietilamino, pirrolidino, imidazol-1-ila, piperidino, piperazino, 4-alquilpiperazino inferior, morfolino, tiomorfolino e piperazino ou 4-metilpiperazino, bem como difenilamino e di-benzilamino substituído, se necessário, especialmente na parte fenila, por
- 20 exemplo, por alquila inferior, alcóxi inferior, halogênio e/ou; dos grupos protegidos, especialmente alcóxicarbonilamino inferior, tipicamente terc-butóxicarbonilamino, fenil-alcóxicarbonilamino inferior, tipicamente 4-metóxibenzilóxicarbonilamino e 9-fluorenilmetóxicarbonilamino.

Amino-alquila inferior é, mais especialmente, substituída na posição 1 da cadeia alquila inferior por amino e é especialmente aminometila.

- 25 Amino-alquila inferior mono- ou dissustituída é amino-alquila inferior substituída por um ou dois radicais, em que amino-alquila inferior é, mais especialmente, substituída por amino na posição 1 da cadeia alquila inferior e é, especialmente, aminometila; os substituintes amino aqui são, de preferência (se 2 substituintes estão presentes no respectivo grupo amino, independentemente um do outro) do grupo compreendendo alquila inferior, tal como especialmente metila, etila ou n-propila, hidróxi-alquila inferior, tipi-

camente 2-hidróxetila, C₃-C₈cicloalquila, especialmente ciclohexila, amino-alquila inferior, tipicamente 3-aminopropila ou 4-aminobutila, N-mono- ou N,N-di(alquil)-amino-alquila inferior, tipicamente 3-(N,N-dimetilamino)propila, amino, N-mono- ou N,N-di-alquilamino inferior e N-mono- ou N,N-di-(hidróxi-alquil)amino inferior.

Amino-alquila inferior dissubstituída é também uma heterociclila de 5 ou 6 elementos, saturada ou insaturada ligada à alquila inferior via um átomo de nitrogênio (de preferência na posição 1) e tendo 0 a 2, especialmente 0 ou 1, de outros heteroátomos selecionados de oxigênio, nitrogênio e enxofre, a qual é não-substituída ou substituída, especialmente por um ou dois radicais do grupo compreendendo alquila inferior, tipicamente metila e também oxo. Preferidos aqui são pirrolidino (1-pirrolidinila), piperidino (1-piperidinila), piperazino (1-piperazinila), 4-alquilpiperazino inferior, tipicamente 4-metilpiperazino, imidazolino (1-imidazolila), morfolino (4-morfolinila) ou também tiomorfolino, S-oxo-tio-morfolino ou S,S-dioxotiomorfolino.

Alquilenodíoxi inferior é, especialmente, metilenodíoxi.

Um grupo carbamoíla trazendo um ou dois substituintes é, especialmente, aminocarbonila

(carbamóila) a qual é substituída por um ou dois radicais no nitrogênio; os substituintes amino aqui são, de preferência, (se 2 substituintes estão presentes no respectivo grupo amino, independentemente um do outro) do grupo compreendendo alquila inferior, tal como especialmente metila, etila ou n-propila, hidróxi-alquila inferior, tipicamente 2-hidróxetila, C₃-C₈cicloalquila, especialmente ciclohexila, amino-alquila inferior, tipicamente 3-aminopropila ou 4-aminobutila, N-mono- ou N,N-di(alquil)-amino-alquila inferior, tipicamente 3-(N,N-dimetilamino)propila, amino, N-mono- ou N,N-di-alquilamino inferior e N-mono- ou N,N-di-(hidróxi-alquil)amino inferior; amino dissubstituído em aminocarbamoíla é também uma heterociclila com 5 ou 6 elementos, saturada ou insaturada com um átomo de nitrogênio de ligação e 0 a 2, especialmente 0 ou 1, de outros heteroátomos selecionados de oxigênio, nitrogênio e enxofre, a qual é não-substituída ou substituída, especialmente por um ou dois radicais do grupo compreendendo alquila inferior, tipicamente

metila e também oxo. Preferidos aqui são pirrolidino (1-pirrolidinila), piperidino (1-piperidinila), piperazino (1-piperazinila), 4-alquilpiperazino inferior, tipicamente 4-metilpiperazino, imidazolino (1-imidazolila), morfolino (4-morfolinila) ou também tiomorfolino, S-oxo-tio-morfolino ou S,S-dioxotiomorfolino.

Uma acila derivada de um ácido sulfônico orgânico, a qual é designada Ac^2 é, especialmente, uma com a subfórmula $\text{R}^\circ\text{-SO}_2^-$, em que R° é uma hidrocarbila conforme definido acima nos significados gerais e específicos, a última também sendo geralmente preferida aqui. Especialmente preferida é uma alquilfenil-sulfonila inferior, especialmente 4-tolueno-sulfonila.

Uma acila derivada de ácido fosfórico, esterificada se necessário, a qual é atribuída com Ac^3 é, especialmente, uma com a subfórmula $\text{R}^\circ\text{O}(\text{R}^\circ\text{O})\text{P}(=\text{O})-$, em que os radicais R° são, independentemente uns dos outros, conforme definido nos significados gerais e específicos indicados acima.

Dados reduzidos sobre substituintes fornecidos aqui antes e aqui depois são considerados como sendo preferências.

Compostos preferidos de acordo com a invenção são, por exemplo, aqueles em que R° tem os seguintes significados preferidos: alquila inferior, especialmente metila ou etila, amino-alquila inferior, em que o grupo amino é não protegido ou protegido por um grupo de amino proteção convencional - especialmente por alcóxicarbonila inferior, tipicamente terc-alcóxicarbonila inferior, por exemplo, terc-butóxicarbonila - por exemplo, aminometila, R,S-, R- ou, de preferência, S-1-aminoetila, terc-butóxicarbonilaminometila ou R,S-, R- ou, de preferência, S-I-(terc-butóxicarbonilamino)etila, carbóxi-alquila inferior, tipicamente 2-carbóxietila, alcóxicarbonil-alquila inferior, tipicamente 2-(terc-butóxicarbonil)etila, ciano-alquila inferior, tipicamente 2-cianoetila, tetrahidropiranilóxi-alquila inferior, tipicamente 4-(tetrahidropiranil)-óximetila, morfolino-alquila inferior, tipicamente 2-(morfolino)etila, fenila, alquilfenila inferior, tipicamente 4-metilfenila, alcóxifenila inferior, tipicamente 4-metóxifenila, imidazolil-alcoxifenila inferior, tipicamente 4-2-(imidazol-1-il)etilóxifenila, carbóxifenila, tipicamente 4-

carbóxifenila, alcóxicarbonilfenila inferior, tipicamente 4-etóxicarbonilfenila ou 4-metóxifenila, halogen-alquilfenila inferior, tipicamente 4-clorometilfenila, pirrolidinofenila, tipicamente 4-pirrolidinofenila, imidazol-1-ilfenila, tipicamente 4-(imidazolil-1-il)fenila, piperazinofenila, tipicamente 4-piperazinofenila, (4-5 alquilpiperazino)fenila inferior, tipicamente 4-(4-metilpiperazino)fenila, morfolinofenila, tipicamente 4-morfolinofenila, pirrolidino-alquilfenila inferior, tipicamente 4-pirrolidinometilfenila, imidazol-1-il-alquilfenila inferior, tipicamente 4-(imidazolil-1-ilmetil)fenila, piperazino-alquilfenila inferior, tipicamente 4-piperazinometilfenila, (4-alquilpiperazinometil)-fenila inferior, tipicamente 4-10 (4-metilpiperazinometil)fenila, morfolino-alquilfenila inferior, tipicamente 4-morfolinometilfenila, piperazinocarbonilfenila, tipicamente 4-piperazinocarbonilfenila ou (4-alquilpiperazino)fenila inferior, tipicamente 4-(4-metilpiperazino)fenila.

Radicais acila Ac^1 preferidos são radicais acila de um ácido carboxílico os quais são caracterizados pela subfórmula $\text{R}^\circ\text{-CO-}$, em que R° tem um dos significados gerais e preferidos acima do radical hidrocarbila R° . Radicais especialmente preferidos R° aqui são alquila inferior, especialmente metila ou etila, amino-alquila inferior, em que o grupo amino é não protegido ou protegido por um grupo de amino proteção convencional, especialmente 20 por alcóxicarbonila inferior, tipicamente terc-alcóxicarbonila inferior, por exemplo, terc-butóxicarbonila, por exemplo, aminometila, R,S-, R- ou, de preferência, S-1-aminoetila, terc-butóxicarbonilaminometila ou R,S-, R- ou, de preferência, S-1-(terc-butóxicarbonilamino)etila, carbóxi-alquila inferior, tipicamente 2-carbóxietila, alcóxicarbonil-alquila inferior, tipicamente 2-(terc-25 butóxicarbonil)etila, tetrahidropiranilóxi-alquila inferior, tipicamente 4-(tetrahidropiranil)óximetila, fenila, imidazolil-alcóxifenila inferior, tipicamente 4-[2-(imidazol-1-il)etil]óxifenila, carbóxifenila, tipicamente 4-carbóxifenila, alcóxi carbonilfenila inferior, tipicamente 4-etóxicarbonilfenila, halogen-alquilfenila inferior, tipicamente 4-clorometilfenila, imidazol-1-ilfenila, tipicamente 4-(imidazolil-1-il)fenila, pirrolidino-alquilfenila inferior, tipicamente 4-pirrolidinometilfenila, piperazino-alquilfenila inferior, tipicamente 4-piperazinometilfenila, (4-alquilpiperazinometil)fenila inferior, tipicamente 4-(4-

metilpiperazinometil)fenila, morfolino-alquilfenila inferior, tipicamente 4-morfolinometilfenila, piperazinocarbonilfenila, tipicamente 4-piperazinocarbonilfenila ou (4-alquilpiperazino)fenila inferior, tipicamente 4-(4-metilpiperazino)fenila.

5 Uma outra acila Ac' preferida é derivada de monoésteres de ácido carbônico e é caracterizada pela subfórmula $\text{R}^\circ\text{-O-CO-}$. Os radicais alquila inferior, especialmente terc-butila, são radicais hidrocarbila especialmente preferidos R° nesses derivados.

Outra acila Ac' preferida é derivada de aminas de ácido carbônico (ou também ácido tiocarbônico) e é caracterizada pela fórmula $\text{R}^\circ\text{HN-C(=W)-}$ ou $\text{R}^\circ\text{R}^\circ\text{N-C(=W)-}$, em que os radicais R° são, independentemente uns dos outros, conforme definido acima e W é enxofre e, especialmente, oxigênio. Em particular, compostos são preferidos em que Ac' é um radical de fórmula $\text{R}^\circ\text{KN-C(=W)-}$, em que W é oxigênio e R° tem um dos seguintes significados preferidos: morfolino-alquila inferior, tipicamente 2-morfolinoetila, fenila, alcóxifenila inferior, tipicamente 4-metóxifenila ou 4-etóxi-fenila, carbóxifenila, tipicamente 4-carbóxifenila ou alcóxicarbonilfenila inferior, tipicamente 4-etóxicarbonilfenila.

Uma acila preferida Ac^2 de subfórmula $\text{R}^\circ\text{-SO}_2^-$, em que R° é uma hidrocarbila conforme definido nos significados gerais e específicos acima, é alquilfenil-sulfonila inferior, tipicamente 4-tolueno-sulfonila.

Se p é 0, o átomo de nitrogênio que liga R_3 é não carregado. Se p é 1, então, R_4 deve também estar presente e o átomo de nitrogênio que liga R_3 e R_4 (nitrogênio quaternário) é, então, positivamente carregado.

25 As definições para um radical alifático, carbocíclico ou carbocílico-alifático com até 29 átomos de carbono cada ou um radical heterocíclico ou heterocíclico-alifático com até 20 átomos de carbono cada e até 9 heteroátomos cada ou acila com até 30 átomos de carbono cada, de preferência, são equivalentes às definições fornecidas para os radicais R_3 e R_4 correspondentes. Especialmente preferido é R_5 alquila inferior, especialmente metila ou, mais especialmente, hidrogênio.

Z é, especialmente, alquila inferior, mais especialmente metila

ou hidrogênio.

Se as duas ligações indicadas por linhas onduladas estão faltando no anel A, então, nenhuma ligação dupla (derivados tetrahidrogenados) está presente entre os átomos de carbono caracterizados na fórmula I pelos números 1, 2, 3 e 4, mas apenas ligações simples, enquanto que o anel B é aromático (ligações duplas entre os átomos de carbono caracterizados na fórmula I por 8 e 9 e aqueles caracterizados por 10 e 11). Se as duas ligações indicadas por linhas onduladas estão faltando no anel B, então, nenhuma ligação dupla (derivados tetrahidrogenados) estão presentes entre os átomos de carbono caracterizados na fórmula I pelos números 8, 9, 10 e 11, mas apenas ligações simples, enquanto que o anel A é aromático (ligações duplas entre os átomos de carbono caracterizados na fórmula I por 1 e 2 e aqueles caracterizados por 3 e 4). Se o total de quatro ligações duplas indicadas por linhas onduladas estão faltando nos anéis A e B e são substituídas por um total de 8 átomos de hidrogênio, então, nenhuma ligação dupla (derivados octa-hidrogenados) está presente nos átomos de carbono numerados 1, 2, 3, 4, 8, 9, 10 e 11 na fórmula I, mas apenas ligações simples.

Por sua natureza, os compostos da invenção também podem estar presentes na forma de sais farmacêutica, isto é, fisiologicamente aceitáveis, contanto que eles contenham grupos de formação de sal. Para isolamento e purificação, sais farmaceuticamente inaceitáveis também podem ser usados. Para uso terapêutico, apenas sais farmaceuticamente aceitáveis são usados e esses sais são preferidos.

Assim, compostos de fórmula I tendo grupos ácidos livres, por exemplo, um grupo sulfo, fosforila ou carboxila livre, podem existir como um sal, de preferência como um sal fisiologicamente aceitável, com um componente básico de formação de sal. Esses podem ser primariamente sais de metal ou amônio, tais como sais de metal alcalino ou metal alcalino terroso, por exemplo, sais de sódio, potássio, magnésio ou cálcio ou sais de amônio com amônia ou aminas orgânicas adequadas, especialmente monoaminas terciárias e bases heterocíclicas, por exemplo, trietilamina, tri-(2-hidróxietil)-

amina, N-etilpiperidina ou N,N'-dimetilpiperazina.

Compostos da invenção tendo um caráter básico também podem existir como sais de adição, especialmente como sais de adição de ácido com ácidos inorgânicos e orgânicos, mas também como sais quaternários. Assim, por exemplo, compostos os quais têm um grupo básico, tal como um grupo amino, como um substituinte podem formar sais de adição de ácido com ácidos comuns. Ácidos adequados são, por exemplo, ácidos hidro-hálicos, por exemplo, ácido clorídrico e hidrobrômico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico ou ácido perclórico ou ácidos carboxílicos ou sulfônicos alifáticos, alicíclicos, aromáticos ou heterocíclicos, tais como ácido fórmico, acético, propiônico, succínico, glicólico, láctico, málico, tartárico, cítrico, fumárico, maleico, hidróximaleico, oxálico, pirúvico, fenilacético, benzóico, p-aminobenzóico, antranílico, p-hidróxibenzóico, salicílico, p-amino-salicílico, pamóico, metano-sulfônico, etano-sulfônico, hidróxietano-sulfônico, etilenodi-sulfônico, halobenzeno-sulfônico, tolueno-sulfônico, naftaleno-sulfônico ou ácido sulfanílico e também metionina, triptofano, lisina ou arginina, bem como ácido ascórbico.

Em vista da relação íntima entre os compostos (especialmente de fórmula I) na forma livre e na forma de seis sais, incluindo aqueles sais que podem ser usados como intermediários, por exemplo, na purificação ou identificação dos novos compostos e de seus solvatos, qualquer referência aqui antes e aqui depois aos compostos livres deve ser entendida como se referindo também aos sais e solvatos correspondentes dos mesmos, por exemplo, hidratos, conforme apropriado e expediente.

Os compostos de fórmula A, B, C, D, I, II, III, IV, V ou VI, especialmente aqueles em que R₅ é hidrogênio, possuem propriedades farmacológicas valiosas.

No caso dos grupos de radicais ou compostos mencionados aqui antes e aqui depois, as definições gerais podem, conforme apropriado e expediente, ser substituídas por definições mais específicas estabelecidas aqui antes e aqui depois.

Preferência é dada a compostos de fórmula I, II, III, IV, V, VI em

que:

R_1 e R_2 são, independentemente um do outro, alquila inferior, alquila inferior substituída por halogênio, C₆-C₁₄arila, hidróxi, alcóxi inferior, fenil-alcóxi inferior, fenilóxi, alcanoilóxi inferior, benzoilóxi, amino, alquilamino inferior, alcanoilamino inferior, fenil-alquilamino inferior, N,N-di-alquilamino inferior, N,N-di-(fenilalquil)amino inferior, ciano, mercapto, alquiltio inferior, carbóxi, alcóxicarbonila inferior, carbamoíla, N-alquilcarbamoíla inferior, N,N-di-alquilcarbamoíla inferior, sulfo, alcano-sulfonila inferior, alcóxi-sulfonila inferior, amino-sulfonila, N-alquilamino-sulfonila inferior ou N,N-di-alquilamino-sulfonila inferior; halogênio; alcóxi inferior; C₆-C₁₄arilóxi; C₆-C₁₄aril-alcóxi inferior; alcanoilóxi inferior; C₆-C₁₄arilcarbonilóxi; amino monosubstituído ou dissubstituído por alquila inferior, C₆-C₁₄arila, C₆-C₁₄aril-alquila inferior, alcanoíla inferior ou C₆-C₁₂arilcarbonila; ciano; nitro; mercapto; alquiltio inferior; C₆-C₁₄ariltio; C₆-C₁₄aril-alquiltio inferior; alcanoiltio inferior; C₆-C₁₄aril-alcanoiltio inferior; carbóxi; alcóxicarbonila inferior, C₆-C₁₄aril-alcóxi carbonila inferior; C₆-C₁₄arilóxicarbonila; carbamoíla; carbamoíla N-mono- ou N,N-dissubstituída por alquila inferior, C₆-C₁₄arila ou C₆-C₁₄aril-alquila inferior; sulfo; C₆-C₁₄aril-sulfonila; C₆-C₁₄aril-alcano-sulfonila inferior; alcano-sulfonila inferior; ou amino-sulfonila N-mono- ou N,N-dissubstituída por alquila inferior, C₆-C₁₄arila ou C₆-C₁₄aril-alquila inferior, em que C₆-C₁₄arila é um radical arila com 6 a 12 átomos de carbono no sistema de anel, o qual pode ser não-substituído ou substituído por halogênio, fenila ou naftila, hidróxi, alcóxi inferior, fenil-alcóxi inferior, fenilóxi, alcanoilóxi inferior, benzoilóxi, amino, alquilamino inferior, alcanoilamino inferior, fenil-alquilamino inferior, N,N-di-alquilamino inferior, N,N-di-(fenil-alquil)amino inferior, ciano, mercapto, alquiltio inferior, carbóxi, alcóxicarbonila inferior, carbamoíla, N-alquilcarbamoíla inferior, N,N-di-alquilcarbamoíla inferior, sulfo, alcano-sulfonila inferior, alcóxi-sulfonila inferior, amino-sulfonila, N-alquilamino-sulfonila inferior ou N,N-di-alquilamino-sulfonila inferior;

30 n e m são, independentemente um do outro, 0 ou 1 ou 2, de preferência 0;

 R₃, R₄, R₈, R₁₀ são, independentemente uns dos outros, hidro-

gênio, alquila inferior, alquenila inferior ou alcadienila inferior os quais são, cada um, não-substituídos ou monossubstituídos ou polissubstituídos, de preferência monossubstituídos ou dissubstituídos por um substituinte independentemente selecionado de alquila inferior; hidróxi; alcóxi inferior, o qual 5 pode ser não-substituído ou mono-, di- ou tri-substituído por (i) heterociclila com 4 a 12 átomos no anel, o qual pode ser insaturado, totalmente saturado ou parcialmente saturado, é monocíclico ou bicíclico e pode conter até três heteroátomos selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre e é, mais especialmente, pirrolila, por exemplo, 2-pirrolila ou 3-pirrolila, piridila, por exemplo, 2-, 3- ou 4-piridila ou, em um sentido mais amplo, também tienila, 10 por exemplo, 2- ou 3-tienila ou furila, por exemplo, 2-furila, indolila, tipicamente 2- ou 3-indolila, quinolila, tipicamente 2- ou 4-quinolila, isoquinolila, tipicamente 3- ou 5-isoquinolila, benzofuranila, tipicamente 2-benzofuranila, cromenila, tipicamente 3-cromenila, benzotienila, tipicamente 2- ou 3- 15 benzotienila; imidazolila, tipicamente 1- ou 2-imidazolila, pirimidinila, tipicamente 2- ou 4-pirimidinila, oxazolila, tipicamente 2-oxazolila, isoxazolila, tipicamente 3-isoxazolila, tiazolila, tipicamente 2-tiazolila, benzimidazolila, tipicamente 2-benzimidazolila, benzoxazolila, tipicamente 2-benzoxazolila, quinazolila, tipicamente 2-quinazolinila, 2-tetrahidrofurila, 4-tetrahidrofurila, 4- 20 tetrahidropiranila, 1-, 2- ou 3-pirrolidila, 1-, 2-, 3- ou 4-piperidila, 1-, 2- ou 3-morfolinila, 2- ou 3-tiomorfolinila, 2-piperazinila ou N,N'-bis-alquil-2-piperazinila inferior, (ii) por halogênio, (iii) por hidróxi ou (iv) por alcóxi inferior; fenóxi; fenil-alcóxi inferior; heterociclolíxi, em que heterociclila é pirrolila, por exemplo, 2-pirrolila ou 3-pirrolila, piridila, por exemplo, 2-, 3- ou 4-piridila 25 ou, em um sentido mais amplo, também tienila, por exemplo, 2- ou 3-tienila ou furila, por exemplo, 2-furila, indolila, tipicamente 2- ou 3-indolila, quinolila, tipicamente 2- ou 4-quinolila, isoquinolila, tipicamente 3- ou 5-isoquinolila, benzofuranila, tipicamente 2-benzofuranila, cromenila, tipicamente 3-cromenila, benzotienila, tipicamente 2- ou 3-benzotienila; imidazolila, tipicamente 1- ou 2-imidazolila, pirimidinila, tipicamente 2- ou 4-pirimidinila, oxazolila, tipicamente 2-oxazolila, isoxazolila, tipicamente 3-isoxazolila, tiazolila, tipicamente 2-tiazolila, benzimidazolila, tipicamente 2-benzimidazolila, ben-

zoxazolila, tipicamente 2-benzoxazolila, quinazolila, tipicamente 2-quinazolinila, 2-tetrahidrofurila, 4-tetrahidrofurila, 2- ou 4-tetrahidropiranila, 1-, 2- ou 3-pirrolidila, 1-, 2-, 3- ou 4-piperidila, 1-, 2- ou 3-morfolinila, 2- ou 3-tiomorfolinila, 2-piperazinila ou N,N'-bis-alquil-2-piperazinila inferior, tal como

5 especialmente 2- ou 4-tetrahidropiranilóxi; alcanoilóxi inferior; carbóxi; alcóxicarbonila inferior; fenil-alcóxicarbonila inferior; mercapto; alquiltio inferior; feniltio; halogênio; halogen-alquila inferior; oxo (exceto na posição 1, caso contrário, acila); azido; nitro; ciano; amino; mono-alquilamino inferior; di-alquilamino inferior; pirrolidino; imidazol-1-ila; piperidino; piperazino; 4-

10 alquilpiperazino inferior; morfolino; tiomorfólico; difenilamino ou dibenzilamino não-substituído ou substituído na parte fenila por alquila inferior, alcóxi inferior, halogênio e/ou nitro; alcóxicarbonilamino inferior; fenil-alcóxicarbonilamino inferior não-substituído ou substituído na parte fenila por alquila inferior ou alcóxi inferior; fluorenilmétóxicarbonilamino; amino-alquila inferior; amino-alquila inferior monossubstituída ou dissustituída, em que o substituinte amino é selecionado de alquila inferior, hidróxi-alquila inferior, C₃-C₈cicloalquila, amino-alquila inferior, N-mono- ou N,N-di(-alquila inferior)amino-alquila inferior, amino, N-mono- ou N,N-di-alquilamino inferior e N-mono- ou N,N-di-(hidróxi-alquil)amino inferior; pirrolidino-alquila inferior; piperidino-alquila inferior; piperazino-alquila inferior; 4-alquilpiperazino-alquila inferior; imidazol-1-il-alquila inferior; morfolino-alquila inferior; tiomorfólico-alquila inferior; S-oxo-tiomorfólico-alquila inferior; S,S-dioxotiomorfólico-alquila inferior; alquilendióxi inferior; sulfamoíla; sulfo; carbamoíla; ureido; guanidino; ciano; aminocarbonila (carbamoaíla) e aminocarbonilóxi, os quais

15 são substituídos por um ou dois radicais sobre o nitrogênio, em que os substituintes amino são selecionados, independentemente uns dos outros, do grupo compreendendo alquila inferior, hidróxi-alquila inferior, C₃-C₈cicloalquila, amino-alquila inferior, N-mono- ou N,N-di(-alquil)amino-alquila inferior, amino, N-mono- ou N,N-di-alquilamino inferior e N-mono- ou N,N-di-

20 (hidróxi-alquil)amino inferior; pirrolidinocarbonila; piperidinocarbonila; piperazinocarbonila; 4-alquilpiperazinocarbonila inferior; imidazolinocarbonila; morfolinocarbonila; tiomorfolinocarbonila; S-oxo-tiomorfolinocarbonila; e S,S-

25

30

dioxotiomorfolino;

fenila, naftila, fenil-alquila inferior ou fenil-alquenila inferior com um radical fenila terminal, a qual é não-substituída ou monossubstituída ou dissubstituída pelos radicais mencionados acima como substituintes de al-

5 quila inferior, alquenila inferior ou alcadienila inferior;

ou heterociclil-alquila inferior, em que heterociclila é pirrolila, por exemplo, 2-pirrolila ou 3-pirrolila, piridila, por exemplo, 2-, 3- ou 4-piridila ou, em um sentido mais amplo, também tienila, por exemplo, 2- ou 3-tienila ou furila, por exemplo, 2-furila, indolila, tipicamente 2- ou 3-indolila, quinolila,

10 tipicamente 2- ou 4-quinolila, isoquinolila, tipicamente 3- ou 5-isoquinolila, benzofuranila, tipicamente 2-benzofuranila, cromenila, tipicamente 3-cromenila, benzotienila, tipicamente 2- ou 3-benzotienila; imidazolila, tipicamente 1- ou 2-imidazolila, pirimidinila, tipicamente 2- ou 4-pirimidinila, oxazolila, tipicamente 2-oxazolila, isoxazolila, tipicamente 3-isoxazolila, tiazolila,

15 tipicamente 2-tiazolila, benzimidazolila, tipicamente 2-benzimidazolila, benzoxazolila, tipicamente 2-benzoxazolila, quinazolila, tipicamente 2-quinazolinila, 2-tetrahidrofurila, 4-tetrahidrofurila, 2- ou 4-tetrahidropiranila, 1-, 2- ou 3-pirrolidila, 1-, 2-, 3- ou 4-piperidila, 1-, 2- ou 3-morfolinila, 2- ou 3-

20 tiomorfolinila, 2-piperazinila ou N,N'-bis-alquila inferior-2-piperazinila os quais, em cada caso, são não-substituídos ou monossubstituídos ou dissustituidos pelos radicais mencionados acima como substituintes de alquila inferior, alquenila inferior ou alcadienila inferior;

ou acila da subfórmula Y-C(=W)-, em que W é oxigênio e Y é hidrogênio, R°, R°-O-, R°HN- ou R°R°N- (em que os radicais R° podem ser

25 os mesmos ou diferentes),

ou

acila da subfórmula R°-SO₂-,

pelo que R₄ pode também estar ausente para o composto de fórmula II;

30 ou

R₄ está ausente para compostos de formula II, hidrogênio ou CH₃ para compostos de fórmula I e

R_3 é acila da subfórmula $Y-C(=W)-$, em que W é oxigênio e Y é hidrogênio, R° , $R^\circ-O-$, $R^\circ-HN-$ ou $R^\circ R^\circ N-$ (em que os radicais R° podem ser os mesmos ou diferentes),

ou

- 5 é acila da subfórmula $R^\circ-SO_2^-$,
 em que R° , nos referidos radicais, tem os seguintes significados:
 alquila inferior não-substituída ou substituída, especialmente metila ou etila,
 amino-alquilhidróxi-alquila inferior, em que o grupo amino é não protegido ou
 é protegido por um grupo de amino proteção convencional - especialmente
 10 por alcóxicarbonila inferior, tipicamente terc-alcóxicarbonila inferior, por e-
 exemplo, terc-butóxicarbonila - por exemplo, aminometila, $R,S-$, $R-$ ou, de pre-
 ferência, $S-1$ -aminoetila, terc-butóxicarbonilaminometila ou $R,S-$, $R-$ ou, de
 preferência, $S-I$ -(terc-butóxicarbonilamino)etila, carbóxi-alquila inferior, tipi-
 camente 2-carbóxietila, alcóxicarbonil-alquila inferior, tipicamente 2-(terc-
 15 butóxicarbonil)etila, ciano-alquila inferior, tipicamente 2-cianoetila, tetrahidro-
 piranilóxi-alquila inferior, tipicamente 4-(tetrahidropiranil)óximetila, morfolino-
 alquila inferior, tipicamente 2-(morfolino)etila, fenila, alquilfenila inferior, tipi-
 camente 4-metilfenila, alcóxifenila inferior, tipicamente 4-metóxifenila, imida-
 zolil-alcóxifenila inferior, tipicamente 4-2-(imidazol-1-il)etil)óxifenila, carbóxi-
 20 fenila, tipicamente 4-carbóxifenila, alcóxi carbonilfenila inferior, tipicamente
 4-etóxicarbonilfenila ou 4-metóxifenila, halogen-alquilfenila inferior, tipica-
 mente 4-clorometilfenila, pirrolidinofenila, tipicamente 4-pirrolidinofenila, imi-
 dazol-1-ilfenila, tipicamente 4-(imidazolil-1-il)fenila, piperazinofenila, tipi-
 camente 4-piperazinofenila, (4-alquilpiperazino)fenila inferior, tipicamente 4-(4-
 25 metilpiperazino)fenila, morfolinofenila, tipicamente 4-morfolinofenila, pirrolidi-
 no-alquilfenila inferior, tipicamente 4-pirrolidinometilfenila, imidazol-1-il-
 alquilfenila inferior, tipicamente 4-(imidazolil-1-ilmetil)fenila, piperazino-
 alquilfenila inferior, tipicamente 4-piperazinometilfenila, (4-
 alquilpiperazinometil)-fenila inferior, tipicamente 4-(4-
 30 metilpiperazinometil)fenila, morfolino-alquilfenila inferior, tipicamente 4-
 morfolinometilfenila, piperazinocarbonilfenila, tipicamente 4-
 piperazinocarbonilfenila ou (4-alquilpiperazino)fenila inferior, tipicamente 4-

(4-metilpiperazino)fenila.

p é 0 se R₄ está ausente ou é 1 se R₃ e R₄ estão ambos presentes e, em cada caso, são um dos radicais antes mencionados (para compostos de fórmula II);

5 R₅ é hidrogênio ou alquila inferior, especialmente hidrogênio,

X significa 2 átomos de hidrogênio, O ou 1 átomo de hidrogênio e hidróxi; ou 1 átomo de hidrogênio e alcóxi inferior;

Z é hidrogênio ou especialmente alquila inferior, mais especialmente metila;

10 e, para compostos da fórmula II, as duas ligações caracterizadas por linhas onduladas estão, de preferência, ausentes no anel A e são substituídas por 4 átomos de hidrogênio e as duas linhas onduladas no anel B cada, junto com a respectiva ligação paralela, significam uma ligação dupla;

ou também as duas ligações caracterizadas por linhas onduladas

15 das estão ausentes no anel B e são substituídas por um total de 4 átomos de hidrogênio e as duas linhas onduladas no anel A cada, junto com a respectiva ligação paralela, significam uma ligação dupla;

ou, no anel A e no anel B, todas as 4 ligações onduladas estão ausentes e são substituídas por um

20 total de 8 átomos de hidrogênio;

ou um sal do mesmo, se pelo menos um grupo de formação de sal está presente.

Preferência particular é dada a um composto de fórmula I em que:

25 m e n são cada 0;

R₃ e R₄ são, independentemente um do outro, hidrogênio, alquila inferior não-substituída ou mono- ou dissustituída, especialmente monossustituída, por radicais independentemente selecionados um do outro de carbóxi; alcóxi carbonila inferior; e ciano;

30 ou

R₄ é hidrogênio ou -CH₃ e

R₃ é conforme definido acima ou, de preferência, R₃ é acila da

- subfórmula $R^{\circ}\text{-CO}$, em que R° é alquila inferior; amino-alquila inferior, em que o grupo amino está presente na forma não-protégida ou é protegido por alcóxi carbonila inferior; tetrahidropiranióxi-alquila inferior; fenila; imidazolil-alcóxifenila inferior; carbóxifenila; alcóxi carbonilfenila inferior; halogeno-alquilfenila inferior; imidazol-1-ilfenila; pirrolidino-alquilfenila inferior; piperazino-alquilfenila inferior; (4-alquilpiperazinometil)fenila inferior; morfolino-alquilfenila inferior; piperazinocarbonilfenila; ou (4-alquilpiperazino)fenila inferior;
- ou é acila da subfórmula $R^{\circ}\text{-O-CO-}$, em que R° é alquila inferior;
- ou é acila da subfórmula $R^{\circ}\text{HN-C(=W)-}$, em que W é oxigênio e R° tem os seguintes significados: morfolino-alquila inferior, fenila, alcóxifenila inferior, carbóxifenila ou alcóxi carbonilfenila inferior;
- ou R_3 é alquilfenil-sulfonila inferior, tipicamente 4-tolueno-sulfonila;
- outros exemplos específicos de grupos R_3 preferidos são descritos abaixo para os compostos preferidos de fórmula II,
- R_5 é hidrogênio ou alquila inferior, especialmente hidrogênio,
X significa 2 átomos de hidrogênio ou O;
Z é metila ou hidrogênio;
- ou um sal do mesmo, se pelo menos um grupo de formação de sal está presente.
- Preferência particular é dada a um composto de fórmula II em que:
- m e n são, cada um, 0;
- R_3 e R_4 são, independentemente um do outro, hidrogênio, alquila inferior não-substituída ou mono- ou dissustituída, especialmente monosubstituída, por radicais independentemente selecionados um do outro de carbóxi; alcóxicarbonila inferior; e ciano; pelo que R_4 pode também estar ausente;
- ou
- R_4 está ausente e
- R_3 é acila da subfórmula $R^{\circ}\text{-CO}$, em que R° é alquila inferior,

- especialmente metila ou etila; amino-alquila inferior, em que o grupo amino é não protegido ou protegido por alcóxicarbonila inferior, tipicamente terc-alcóxicarbonila inferior, por exemplo, terc-butóxicarbonila, por exemplo, amionometila, R,S-, R- ou, de preferência, S-1-aminoetila, terc-
- 5 butóxicarbonilaminometila ou R,S-, R- ou, de preferência, S-1-(terc-butóxicarbonilamino)etila; tetrahidropiranilóxi-alquila inferior, tipicamente 4-(tetrahidropirani)óximetila; fenila; imidazolil-alcóxifenila inferior, tipicamente 4-[2-(imidazol-1-il)etil]óxifenila; carbóxifenila, tipicamente 4-carbóxifenila; alcóxi carbonilfenila inferior, tipicamente 4-metóxi- ou 4-etóxicarbonilfenila;
- 10 halogen-alquilfenila inferior, tipicamente 4-clorometilfenila; imidazol-1-ilfenila, tipicamente 4-(imidazolil-1-il)fenila; pirrolidino-alquilfenila inferior, tipicamente 4-pirrolidinometilfenila; piperazino-alquilfenila inferior, tipicamente 4-piperazinometilfenila; (4-alquilpiperazinometil)fenila inferior, tipicamente 4-(4-metilpiperazinometil)fenila; morfolino-alquilfenila inferior, tipicamente 4-morfolinometilfenila; piperazinocarbonilfenila, tipicamente 4-piperazinocarbonilfenila; ou (4-alquilpiperazino)-fenila inferior, tipicamente 4-(4-metilpiperazino)fenila;
- 15 ou é acila da subfórmula $R^{\circ}\text{-O-CO-}$, em que R° é alquila inferior;
ou é acila da subfórmula $R^{\circ}\text{HN-C(=W)-}$, em que W é oxigênio e
- 20 R° tem os seguintes significados preferidos: morfolino-alquila inferior, tipicamente 2-morfolinoetila, fenila, alcóxifenila inferior, tipicamente 4-metóxifenila ou 4-etóxifenila, carbóxifenila, tipicamente 4-carbóxifenila ou alcóxicarbonilfenila inferior, tipicamente 4-etóxicarbonilfenila;
- 25 ou é alquilfenil-sulfonila inferior, tipicamente 4-tolueno-sulfonila;
p é 0 se R₄ está ausente ou é 1 se R₃ e R₄ estão ambos presentes e, em cada caso, são um dos radicais antes mencionados;
- R₅ é hidrogênio ou alquila inferior, especialmente hidrogênio,
X significa 2 átomos de hidrogênio ou O;
Z é metila ou hidrogênio;
- 30 e as duas ligações caracterizadas por linhas onduladas estão, de preferência, ausentes no anel A e são substituídas por 4 átomos de hidrogênio e as duas linhas onduladas no anel B cada, junto com a respectiva

ligação paralela, significam uma ligação dupla;

ou também as duas ligações caracterizadas por linhas onduladas estão ausentes no anel B e são substituídas por um total de 4 átomos de hidrogênio e as duas linhas onduladas no anel A cada, junto com a respectiva ligação paralela, significam uma ligação dupla;

ou no anel A e no anel B, todas as 4 ligações onduladas estão ausentes e são substituídas por um total de 8 átomos de hidrogênio;

ou um sal do mesmo, se pelo menos um grupo de formação de sal está presente.

10 Compostos mais especialmente preferidos de fórmula II são selecionados de:

8,9,10,11 -Tetrahidrostaurosporina;

N-4-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)benzoil-1,2,3,4-tetrahidrostaurosporina;

15 N-(4-clorometilbenzoil)-1,2,3,4-tetrahidrostaurosporina;

N-(4-(pirrolidin-1-ilmetil)benzoil)-1,2,3,4-tetrahidrostaurosporina;

N-(4-(morfolin-4-ilmetil)benzoil)-1,2,3,4-tetrahidrostaurosporina;

N-(4-(piperazin-1-ilmetil)benzoil)-1,2,3,4-tetrahidrostaurosporina;

N-etil-1,2,3,4-tetrahidrostaurosporina;

20 N-tosil-1,2,3,4-tetrahidrostaurosporina;

N-triflouroacetil-1,2,3,4-tetrahidrostaurosporina;

N-4-(2-imidazol-1-il-etóxi)benzoil]-1,2,3,4-tetrahidrostaurosporina;

N-metóxicarbonilmetil-1,2,3,4-tetrahidrostaurosporina;

25 N-carbóximetil-1,2,3,4-tetrahidrostaurosporina;

N-tereftaloilmetil éster-1,2,3,4-tetrahidrostaurosporina;

N-tereftaloil-1,2,3,4-tetrahidrostaurosporina;

N-(4-etilpiperazinilcarbonilbenzoil)-1,2,3,4-tetrahidrostaurosporina;

30 N-(2-cianoetil)-1,2,3,4-tetrahidrostaurosporina;

N-benzoil-1,2,3,4-tetrahidrostaurosporina;

Iodeto de N,N-dimetil-1,2,3,4-tetrahidrostaurosporíno;

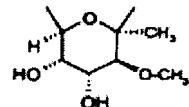
N-BOC-glicil-1,2,3,4-tetrahidrostaurosporina;
N-glicil-1,2,3,4-tetrahidrostaurosporina;
N-(3-(terc-butóxicarbonil)propil)-1,2,3,4-tetrahidrostaurosporina;
N-(3-carbóxipropil)-1,2,3,4-tetrahidrostaurosporina;
5 N-(4-imidazol-1-il)benzoil]-1,2,3,4-tetrahidrostaurosporina;
N-[(tetrahidro-2h-piran-4-ilóxi)acetil]-1,2,3,4-
tetrahidrostaurosporina;
N-BOC-1-alanil-1,2,3,4-tetrahidrostaurosporina;
Hidrocloreto de N-1-alanil-1,2,3,4-tetrahidrostaurosporina;
10 N-metil-1,2,3,4-tetrahidro-6-metilstaurosporina;
N-(4-carbóxifenilaminocarbonil)-1,2,3,4-tetrahidrostaurosporina;
N-(4-etilfenilaminocarbonil)-1,2,3,4-tetrahidrostaurosporina;
N-(N-fenilaminocarbonil)-1,2,3,4-tetrahidrostaurosporina;
N-(N-t2-(1-morfolino)etil]aminocarbonil)-1,2,3,4-
15 tetrahidrostaurosporina;
N-(N-4-metóxifenil]aminocarbonil)-1,2,3,4-
tetrahidrostaurosporina;
1,2,3,4-tetrahidro-6-metilstaurosporina;
N-BOC-1,2,3,4-tetrahidrostaurosporina;
20 N-BOC-1,2,3,4-tetrahidro-6-metilstaurosporina;
N-BOC-1,2,3,4-tetrahidro-6-metil-7-oxo-estaurosporina;
1,2,3,4,8,9,10,11-octahidrostaurosporina;
ou um sal farmaceuticamente aceitável dos mesmos, se pelo
menos um grupo de formação de sal está presente.
25 Mais especialmente preferido é o composto de fórmula I designado 1,2,3,4-tetrahidro-estaurosporina ou um sal domesmo (particularmente, farmaceuticamente aceitável) (aqui, m e n na fórmula I são 0, R₃ é hidrogênio, R₄ está ausente, contanto que nenhum sal esteja presente (p = 0) ou é hidrogênio se um sal está presente (p = 1), R₅ é hidrogênio, as duas ligações representadas por linhas onduladas estão ausentes no anel A e são substituídas por um total de 4 átomos de hidrogênio e as duas ligações representadas por linhas onduladas no anel B são, em cada caso, uma ligação dupla
30

junto com as ligações paralelas, X significa 2 átomos de hidrogênio e Z é metila).

Mais especialmente preferidos são os compostos de fórmula A em que:

- 5 A) X = O; R₁, R₂, R₅ = H; Q = -(CH₂)₂-O-CH(CH₂)OH-(CH₂)₂-;
 B) X = O; R₁, R₂, R₅ = H; Q = -(CH₂)₂-O-CH(CH₂N(CH₃)₂)-(CH₂)₂-;

;



- C) X = 2 átomos de hidrogênio; R₁, R₂, R₅ = H; Q =

Mais especialmente preferidos são os compostos de fórmula I
 10 em que:

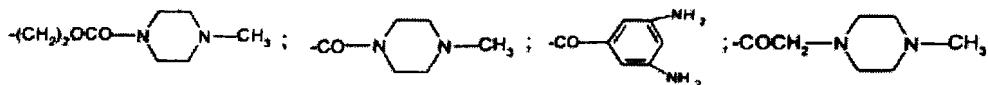
- A) X = 2 átomos de hidrogênio; R₁, R₂, R₃, R₅ = H; R₄ = CH₃; Z = CH₃ (estaurosporina);

- B) X = 1 átomo de hidrogênio e 1 hidróxi na forma isomérica (R) ou (S); R₁, R₂, R₃, R₅ = H; R₄ = CH₃; Z = CH₃ (UCN-01 e UCN-02);

- 15 C) X = 2 átomos de hidrogênio; R₁, R₂, R₅ = H; R₄ = CH₃; R₃ = benzoíla; Z = CH₃ (CGP41251 ou PKC412 ou MIDOSTAURINA);

- D) X = O; R₁, R₂, R₅ = H; R₃ = CH₃; R₄ = etilóxicarbonila; Z = CH₃ (NA 382 ; CAS=143086-33-3);

- E) X = 1 átomo de hidrogênio e 1 hidróxi; R₁, R₂, R₅ = H; R₃ = CH₃; Z = CH₃; e R₄ é selecionado de -(CH₂)₂OH; -CH₂CH(OH)CH₂OH; -CO(CH₂)₂CO₂Na; -(CH₂)₃CO₂H; -COCH₂N(CH₃)₂;



- F) X = 2 átomos de hidrogênio; R₁, R₂, R₅ = H; R₃ = CH₃; Z = CH₃; e R₄ é selecionado de N-O-(tetrahidropiran-4-il)-D-lactoíla; N-2-metil-2-(tetrahidropiran-4-ilóxi)-propionila; 25 N-O-(tetrahidropiran-4-ila)-L-lactoíla]; N-O-(tetrahidropiran-4-il)-D-lactoíla]; N-2-(tetrahidropiran-4-ilóxi)-acetila);

- G) X = O; R₁, R₂, R₅ = H; R₃ = CH₃; Z = CH₃; e R₄ é selecionado de N-[O-(tetrahidropiran-4-il)-D-lactoíla]; N-2-(tetrahidropiran-4-ilóxi)-acetila);

H) X = 1 átomo de hidrogênio e 1 hidróxi; R₁, R₂, R₅ = H; R₃ = CH₃; Z = CH₃; e R₄ é selecionado de N-0-(tetrahidropiran-4-il)-D-lactoíla]; N-2-(tetrahidro-piran-4-ilóxi)-acetila).

A abreviação "CAS" significa o número de registro em CHEM-5 CAL ABSTRACTS.

Os compostos mais preferidos de fórmula I, por exemplo, MIDOSTAURINA [Nome Não Patenteado Internacional são abrangidos e foram especificamente descritos pela patente Européia Nº 0 296 110 publicada em 21 de Dezembro de 1988, bem como na Patente US Nº 5.093.330 publicada 10 em 3 de Março de 1992 e Patente Japonesa Nº 2 708 047. Outros compostos preferidos são abrangidos e descritos pelos pedidos de patente WO 95/32974 e WO 95/32976, ambos publicados em 7 de Dezembro de 1995. Todos os compostos descritos nesses documentos são incorporados ao presente pedido por referência.

15 Mais especialmente preferidos são os compostos de fórmula III em que:

A) X = 2 átomos de hidrogênio; R₁, R₂, R₅ = H; R₈ = CH₃; R₇ = metilóxicarbonila; Z = H (2-metila, K252a);

20 B) X = 2 átomos de hidrogênio; R₁, R₂, R₅, R₈ = H; R₇ = metilóxi-carbonila; Z = H (K-252a);

C) X = 2 átomos de hidrogênio; R₁, R₂, R₅, R₈ = H; R₇ = metilóxi-carbonila; Z = CH₃ (KT-5720).

Mais especialmente preferidos são os compostos de fórmula IV em que:

25 A) X = O; R₁, R₂, R₅ = H; R₉ = CH₂-NMe₂; R₈ = CH₃; m' = n' = 2;

B) X = O; R₁, R₂, R₅ = H; R₉ = CH₂-NH₂; R₈ = CH₃; m' = 2; n' = 1 (Ro-31-8425; CAS = 151342-35-7).

Mais especialmente preferidos são os compostos de fórmula V em que:

30 A) X = O; R₁, R₂, R₅ = H; R₈ = CH₃; R₁₀ = -(CH₂)₃-NH₂ (Ro-31-7549; CAS = 138516-31);

B) X = O; R₁, R₂, R₅ = H; R₈ = CH₃; R₁₀ = -(CH₂)₃-S-(C=NH)-NH₂

(Ro-31-8220 ; CAS = 125314-64-9);

C) X = O; R₁, R₂, R₅ = H; R₈ = CH₃; R₁₀ = -CH₃.

Mais especialmente preferidos são os compostos de fórmula VI em que:

- 5 A) X = 2 átomos de hidrogênio; R₁, R₂, R₅ = H; R₄ = CH₃; Z = CH₃; R₃ selecionado de metila ou (C₁-C₁₀)alquila, arilmetila, C₆H₅CH₂-.

DERIVADOS DE ESTAUROSPORINA e seu processo de fabricação foram especificamente descritos em muitos documentos anteriores, bem como por aqueles versados na técnica.

- 10 Compostos de fórmula A, B, C, D e seu processo de fabricação, por exemplo, foram descritos na patente Européia Nº 0 657 458 publicada em 14 de Junho de 1995, na patente Européia Nº 0 624 586 publicada em 17 de Novembro de 1994, na patente Européia Nº 0 470 490 publicada em 12 de Fevereiro de 1992, na patente Européia Nº 0 328 026 publicada em 16
15 de Agosto de 1989, na patente Européia Nº 0 384 349 publicada em 29 de Agosto de 1990, bem como em muitas publicações, tal como *Barry M. Trost e Weiping Tang*, Org. Lett., 3(21), 3409-3411.

- Compostos de fórmula I e seus processos de fabricação foram especificamente descritos nas patentes Européias Nº 0 296 110 publicada 20 em 21 de Dezembro de 1988, bem como na patente US Nº 5.093.330 publicada em 3 de Março de 1992 e Patente Japonesa Nº 2 708 047. Compostos de fórmula I tendo uma substituição de tetrahidropiran-4-il-lactoíla sobre R₄ foram descritos na patente Européia Nº 0 624 590 publicada em 17 de Novembro de 1994. Outros compostos foram descritos na patente Européia Nº 25 0 575 955 publicada em 29 de Dezembro de 1993, patente Européia Nº 0 238 011 publicada em 23 de Setembro de 1987 (UCN-01), pedido de patente Internacional EP98/04141 publicado como WO99/02532 em 03 de Julho de 1998.

- 30 Compostos de fórmula II e seus processos de fabricação foram especificamente descritos nas patentes Européias Nº 0 296 110 publicada em 21 de Dezembro de 1988, bem como na Patente US Nº 5.093.330 publicada em 3 de Março de 1992 e Patente Japonesa Nº 2 708 047.

Compostos de fórmula III e seus processos de fabricação foram especificamente descritos nos pedidos de patente que reivindicam a prioridade do pedido de Patente US 920102 depositado em 24 de Julho de 1992 (isto é, patentes Européias Nº 0 768 312 publicada em 16 de Abril de 1997, 5 Nº 1 002 534 publicada em 24 de Maio de 2000, Nº 0 651 754 publicada em 10 de Maio de 1995).

Compostos de fórmula IV e seus processos de fabricação foram especificamente descritos nos pedidos de patente que reivindicam a prioridade dos pedidos de patente Britânica GB 9309602 e GB 9403249, respectivamente depositados em 10 de Maio de 1993 e 21 de Fevereiro de 1994 (isto é, patentes Européias Nº 0 624 586 publicada em 17 de Novembro de 10 1994, Nº 1 002 534 publicada em 24 de Maio de 2000, Nº 0 651 754 publicada em 10 de Maio de 1995).

Compostos de fórmula V e seus processos de fabricação foram especificamente descritos nos pedidos de patente que reivindicam a prioridade dos pedidos de patente Britânica GB 8803048, GB 8827565, GB 8904161 e GB 8928210, respectivamente depositados em 10 de Fevereiro de 1988, 25 de Novembro de 1988, 23 de Fevereiro de 1989 e 13 de Dezembro de 1989 (isto é, patentes Européias Nº Nº 0 328 026 publicada em 20 16 de Agosto de 1989 e Nº 0 384 349 publicada em 29 de Agosto de 1990).

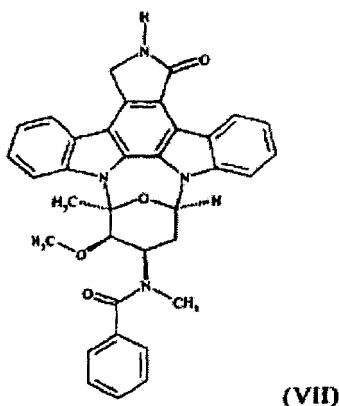
Compostos de fórmula VI e seus processos de fabricação foram especificamente descritos nos pedidos de patente que reivindicam a prioridade dos pedidos de patente US 07/777.395 (Con), depositado em 10 de Outubro de 1991 (isto é, pedido de patente Internacional WO 93/07153 publicado em 25 15 de Abril de 1993).

Em cada caso, onde citações de pedidos de patente ou publicações científicas são fornecidas, em particular para os compostos DERIVADOS DE ESTAUROSPORINA, o assunto em questão dos produtos finais, preparados farmacêuticos e reivindicações é aqui incorporado ao presente 30 pedido por referência a essas publicações.

A estrutura dos agentes ativos identificados pelos nºs De código, nomes genéricos ou marcas comerciais pode ser tomada da edição atual do

compêndio padrão "The Merck Index" ou de bancos de dados, por exemplo, Patentes Internacionais (por exemplo, IMS World Publications). O conteúdo correspondente dos mesmos é aqui incorporado por referência.

O DERIVADO DE ESTAUROSPORINA de acordo com a invenção é N-(9S,10R,11R,13R)-2,3,10,11,12,13-hexahidro-10-metóxi-9-metil-1-oxo-9,13-epóxi-1H,9H-di-indolo1,2,3-gh:3',2',1'-lm]pirrolo 3,4-j 1,7 benzodiazonin-11-il-N-metilbenzamida da fórmula (VII):



ou um sal do mesmo (aqui depois: "Composto de fórmula VII ou MIDOSTAURINA").

O composto de fórmula VII é também conhecido como MIDOSTAURINA Nome Não Patenteado Internacional ou PKC412.

MIDOSTAURINA é um derivado da estaurosporina alcalóide que ocorre naturalmente e foi especificamente descrita na Patente Européia Nº 0 296 110 publicada em 21 de Dezembro de 1988, bem como na Patente US Nº 5.093.330 publicada em 3 de Março de 1992 e Patente Japonesa Nº 2 708 047.

Ácidos Nucleicos

Moléculas de ácido nucleico que inibem a apoptose ou morte celular programada incluem, mas não estão limitadas a, oligonucleotídeos antissenso e estruturas de RNAi específicas ao gene que codifica a proteína MCL1 anti-apoptótica ou a transcritos desse gene. Mais preferido para uso na combinação da invenção é um constructo de RNAi específica para Mcl-1, incluindo especialmente, um siRNA específico para mcl-1. Constructos de RNAi para mcl-1 exemplificativas da invenção são descritas nos exemplos.

A proteína codificada pela sequência 1 de leucemia de células mieloides (BCL2-relacionada) ("mcl-1") pertence à família Bcl-2. O *Splicing* alternativo ocorre nesse *locus* genético, resultando em duas variantes de transcrito que codificam isoformas distintas. O produto genético mais longo (isoforma 1) intensifica a sobrevivência celular através de inibição de apoptose. O produto genético mais curto com *splicing* alternativo (isoforma 2) promove a apoptose e induz à morte. Aliases do gene mcl-1 incluem, mas não estão limitadas a, EAT, MCL1L, MCL1S, MGC104264, MGC1839 e TM. Designações alternativas do polipeptídeo MCL1 incluem, mas não estão limitadas a: proteína de diferenciação de células de leucemia mielóide induzida Mcl-1; sequência 1 de leucemia de células mieloides; e sequência 1 de leucemia de células mieloides, isoforma 1.

Conforme usado aqui, o termo "molécula de ácido nucleico" se destina a incluir moléculas de DNA (por exemplo, cDNA ou DNA gênico ou oligonucleotídeos) e moléculas de RNA (por exemplo, mRNA e estruturas de RNAi, tais como siRNA, shRNA) e análogos das moléculas de DNA ou RNA gerados usando análogos de nucleosídeo. A molécula de ácido nucleico pode ser fita simples ou fita dupla. Onde fita simples, o ácido nucleico pode ser uma fita senso ou uma fita antissenso. O termo inclui DNA sintético (por exemplo, quimicamente sintetizado). Ácidos nucleicos podem ser sintetizados usando análogos ou derivados de nucleosídeo (por exemplo, nucleotídeos de inosina ou fosforotioato). Tais nucleosídeos podem ser usados, por exemplo, para preparar ácidos nucleicos que têm capacidades de emparelhamento de base alteradas ou resistência aumentada à nucleases.

A invenção abrange RNAi ou moléculas de ácido nucleico antissenso específicas a uma sequência de nucleotídeo mcl-1 incluindo, por exemplo, o cDNA de mc1-1. A sequência de cDNA da isoforma 1 mcl-1 mais longa (acesso no. GenBank no. NM_021960) é proporcionada em SEQ ID Nº: 1.

Acesso ao GenBank no. NM021960, mRNA linear de 4020 bp, PRI 12-JUN-2006 [Homo sapiens] (SEQ ID Nº: 1)

A invenção ainda abrange moléculas de ácido nucleico que diferem da sequência de nucleotídeo de SEQ ID N°: 1 em virtude de degenerâncias.

cia do codíco genético, mas que codificam a mesma proteína de mcl-1 que aquela codificada por SEQ ID Nº: 1. O polipeptídeo MCL1 de 350 aa (acesso ao GenPep no. NP068779) codificado pelo nucleotídeo de SEQ ID Nº: 1 é proporcionado como SEQ ID Nº: 2.

- 5 Sequência 1 de leucemia de células mielóides, acesso ao GenPept no. NP068779 350, isoforma 1 PRI 12-JUN-2006 [Homo sapiens]. (SEQ ID Nº:2)

```

1 mfglkrnavi glnlycggag lgagsggatr pggrllatek easarreigg geagaviggs
61 agasppstlt pdsrrvarpp pigaevpdvt ptrlrliffa ptrraapleee meapaadalm
121 speeeldgye peplgkrpav lpllelvges qnntstdgsl pstpppaeee edelyrqsle
181 iisrylreqa tgakdtkpmng rsgatsrkal etlrrvgdgv qrnhetafqg mlrkldikne
241 ddvkslsrvm ihvfdsgvtn wgrivtlisf gafvahklt inqesciepl aesitdvldr
301 tkrdwlvkqr gwdgfveffh vedleggirn vllafagvag vgaglaylir

```

Será apreciado por aqueles versados que polimorfismos da sequência de DNA que levam à alterações nas sequências de aminoácido de mcl-1 podem existir dentro de uma determinada população (por exemplo, 10 uma população humana). Tais polimorfismos genéticos podem existir dentro de uma população em virtude de variação alélica natural. Tais variações alélicas naturais podem, tipicamente, resultar em variação de 15% na sequência de nucleotídeo do gene de mcl-1. Qualquer e todas de tais variações de nucleotídeo, quer "silenciosas" ou resultando em polimorfismos de aminoácido 15 que são o resultado de variação alélica e que não alteram a atividade funcional de mcl-1, se destinam a estar dentro do escopo da invenção. Assim, por exemplo, 1%, 2%, 3%, 4% ou 5% dos aminoácidos em mcl-1 podem ser substituídos por outro aminoácido, por exemplo, através de substituições conservativas.

20 Além de variantes alélicas que ocorrem naturalmente da sequência de mcl-1 que podem existir na população, aqueles versados apreciarão que alterações podem ser introduzidas através de mutação da sequência de nucleotídeo de SEQ ID Nº: 1, desse modo, levando à alterações na sequência de aminoácido da proteína codificada sem alteração da capacida- 25 de funcional da proteína. Por exemplo, pode-se fazer substituições de nucleotídeo que levam a substituições de aminoácido em resíduos de aminoácido "não-essenciais". Um resíduo de aminoácido "não-essencial" é um resíduo que pode ser alterado da sequência do tipo silvestre da proteína de mcl-1

humana sem alterar a atividade biológica da proteína de mcl-1, enquanto que um resíduo de aminoácido "essencial" é requerido para atividade biológica. Por exemplo, resíduos de aminoácido que são conservados dentre proteínas de mcl-1 de várias espécies são previstos como sendo particularmente não passíveis de alteração.

Consequentemente, moléculas de ácido nucleico que codificam proteínas de mcl-1 que contêm alterações em resíduos de aminoácido que não são essenciais para atividade são incluídas na presente invenção. Tais proteínas de mcl-1 diferem, quanto à sequência de aminoácido, de SEQ ID N°: 2 e ainda retêm pelo menos uma porção da atividade biológica do tipo silvestre. Em uma modalidade, por exemplo, a molécula de ácido nucleico isolada inclui uma sequência que codifica uma proteína que inclui uma sequência de aminoácido pelo menos cerca de 75% idêntica, por exemplo, 80%, 85%, 90%, 95% ou 98% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID N°: 2, sobre todo o comprimento de SEQ ID N°: 2.

Uma molécula de ácido nucleico isolada que codifica uma proteína de mcl-1 tendo uma sequência que difere de SEQ ID N°: 2 pode ser criada através de introdução de uma ou mais substituições, adições ou deleções de nucleotídeo em SEQ ID N°: 1, de modo que uma ou mais substituições, adições ou deleções de aminoácido sejam introduzidas na proteína codificada. Mutações podem ser introduzidas através de técnicas padrões, por exemplo, mutagênese sítio dirigida e mutagênese PCR mediada. Substituição de aminoácido conservativa pode ser feita em um ou mais resíduos de aminoácido não-essenciais previstos. Assim, por exemplo, até 1%, 2%, 3%, 5% ou 10% dos aminoácidos podem ser substituídos por uma substituição conservativa. Uma "substituição de aminoácido conservativa" é uma na qual um resíduo de aminoácido é substituído por outro tendo uma cadeia lateral similar. Famílias de resíduos de aminoácido tendo cadeias laterais similares são conhecidas na técnica. Elas incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares não-carregadas (por exemplo, glicina, aspargina, glutamina, serina, treonina, ti-

rosina, cisteína) cadeias laterais não-polares (por exemplo, alanina, valina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadeias laterais beta ramificadas, (por exemplo, treonina, valina, isoleucina)) e cadeias laterais aromáticas (por exemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Assim,

5 um resíduo de aminoácido não-essencial previsto em mcl-1 pode ser substituído por outro resíduo de aminoácido da mesma família de cadeia lateral. Alternativamente, mutações podem ser introduzidas aleatoriamente ao longo de toda ou parte de uma sequência de codificação de mcl-1, tal como através de mutagênese por saturação e os mutantes resultantes podem ser selecionados com relação à atividade biológica de mcl-1 para identificar mutantes que retêm a atividade. Após mutagênese, a proteína pode ser expressa e sua atividade determinada.

10

A presente invenção também abrange moléculas de ácido nucleico antissenso, isto é, moléculas que são complementares a uma fita senso, por exemplo, complementares à fita de codificação de uma molécula de cDNA fita dupla ou complementares a uma sequência de mRNA. Um ácido nucleico antissenso pode se ligar, através de hidrogênio, à fita senso correspondente. O ácido nucleico antissenso pode ser complementar a toda a sequência de codificação de mcl-1 ou apenas a uma porção da mesma. Uma molécula de ácido nucleico antissenso pode ser antissenso a uma região de da fita senso. As regiões de não-codificação ("regiões não-traduzidas 5' e 3'") são as sequências 5' e 3' que flanqueiam a região de codificação de um gene ou mRNA e são não-traduzidas. A molécula de ácido nucleico antissenso pode ser complementar a toda a região de codificação do mRNA de mcl-1 ou, em alguns casos, complementar apenas a uma porção da região de codificação ou não-codificação 3' ou 5' do mRNA de mcl-1. Um oligonucleotídeo antissenso pode ter, por exemplo, cerca de 5, por exemplo, cerca de 10, 15, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ou cerca de 50 nucleotídeos de comprimento. Para orientação geral referente a ácidos nucleicos antissenso veja, por exemplo, Goodchild, "Inhibition of Gene Expression by Oligonucleotides" em Topics in Molecular and Structural Biology, Vol. 12: Oligodeoxynucleotides (Cohen, ed.), MacMillan Press, Londres, páginas 53-77 (1989). Oligonu-

20

25

30

cleotídeos antissenso úteis exemplificativos incluem, mas não estão limitados a, oligonucleotídeos antissenso que incluem uma sequência de pelo menos 12 nucleotídeos complementar a uma região entre os nucleotídeos 131 e 1183 de SEQ ID N°: 1. Veja também SEQ ID NOs: 7-9 nos Exemplos.

- 5 Um ácido nucleico antissenso da invenção pode ser construído usando síntese química, reações de ligação enzimática e outros procedimentos conhecidos na técnica. Por exemplo, um ácido nucleico antissenso (por exemplo, um oligonucleotídeo antissenso) pode ser sintetizado usando nucleotídeos que ocorrem naturalmente ou nucleotídeo variadamente modificados projetados para aumentar a estabilidade biológica das moléculas e/ou estabilidade física da dupla formada entre ácidos nucleicos antissenso e senso. Por exemplo, derivados de fosforotioato e nucleotídeos acridina-substituídos podem ser usados. Nucleotídeo modificados exemplificativos úteis para a geração de ácidos nucleicos antissenso incluem 5-fluorouracila, 10 5-bromouracila, 5-clorouracila, 5-iodouracila, hipoxantina, xantina, 4-acetilciⁿsina, 5-(carbóxi-hidroxilmetyl) uracila, 1-metilguanina, 5-carboximetilaminometila, 2-tiouridina, 2,2-dimetilguanina, di-hidrouracila, beta-D-galactosilqueosina, 5-carboximetilaminometiluracila, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilinosina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 4-15 tiouracila, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metoxiuracila, 5-metilaminometiluracila, 5-metoxiaminometil-2-tiouracila, pseudouracila, queosina, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracila, 5-metil-2-tiouracila, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, 2-tiocitosina, 20 2-tiouracila, 5-metiluracila, metiléster de ácido uracil-5-oxiacético, 5-metil-2-tiouracila, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracila, (acp3)w e 2,6-diaminopurina. Alternativamente, um ácido nucleico antissenso pode ser produzido usando um vetor de expressão, no qual um ácido nucleico tenha sido subclonado em uma orientação antissenso (isto é, RNA transscrito do ácido nucleico inserido será complementar a um ácido nucleico-alvo de interesse, descrito ainda na subseção a seguir).
- 25 30

As moléculas de ácido nucleico antissenso da invenção podem

ser administradas a um indivíduo ou geradas *in situ*, de modo que elas se hibridizam com ou se ligam ao mRNA celular e/ou DNA genômico que codifica uma proteína de mcl-1. Dessa forma, os ácido nucleico antissenso podem inibir a expressão da proteína, por exemplo, através de inibição de transcrição e/ou tradução. Hibridização pode ser através de complementaridade de nucleotídeo convencional para formar uma dupla estável ou, no caso de uma molécula de ácido nucleico antissenso que se liga a duplas de DNA, através de interações específicas na principal ranhura da hélice dupla.

Ácidos nucleicos antissenso podem ser administrados através de qualquer método conhecido na técnica, por exemplo, através de injeção direta em um local tecidual. Alternativamente ou além disso, moléculas de ácido nucleico antissenso podem ser adaptadas a uma célula-alvo selecionada, de modo que elas possam ser administradas sistemicamente. Para administração sistêmica, moléculas antissenso podem ser modificadas, de modo que elas se liguem especificamente aos receptores ou抗ígenos expressos sobre uma superfície celular, por exemplo, através de ligação das moléculas de ácido nucleico antissenso a peptídeos ou anticorpos que se ligam a receptores ou抗ígenos na superfície celular. Moléculas de ácido nucleico antissenso também pode ser distribuídas às células usando determinados vetores descritos aqui. Estruturas de vetor nas quais a sequência a ser transcrita é colocada sob o controle de um promotor pol II ou pol III forte podem ser usadas para obter concentrações intracelulares suficientes de transcriptos antissenso.

Uma molécula de ácido nucleico antissenso da invenção pode também ser uma molécula de ácido nucleico anomérica. Uma molécula de ácido nucleico anomérica forma híbridos fita dupla específicos com RNA complementar no qual, contrário às unidades B usuais, as fitas correm em paralelo umas às outras (Gaultier et al (1987) Nucleic Acids Res 15: 6625-6641). A molécula de ácido nucleico antissenso pode também incluir um 2' o metilribonucleotídeo (Inoue et al (1987) Nucleic Acids Res 15: 6131-6148) ou um análogo de DNA/RNA químérico (1987) FEBS Lett 215: 327-330).

A invenção também inclui ácidos nucleicos capazes de suprimir

a expressão de mcl-1 por meio de interferência de RNA (RNAi). RNAi é um processo pelo qual RNA de fita dupla (dsRNA) induz à degradação sequênci-a-específica de mRNA homólogo em células de animais e plantas (Hutvagner e Zamore (2002) Cur. Opin Gene. Dev 12: 225-232; Sharp (2001) Genes Dev. 15: 485-490. Em células de mamífero, RNAi pode ser disparado, por exemplo, através de RNAs duplos com 21 nucleotídeos (nt), também deno-minados pequenos RNAs inibitórios (siRNAs) (Chiu et al (2001) Mol Cell 10: 5 549-561; Elbashir et al, Nature 411: 494-498; ou através de micro-RNA (miRNA), pequeno RNA de hairpina funcional (shRNA) ou dsRNAs que são 10 expressos *in vivo* usando modelos de DNA com promotores de RNA polime-rase III (Zeng et al (2002) Mol Cell 9: 1327-1333; Paddison et al (2002) Ge-nes Dev 16: 948-958; Lee et al Nature Biotechnol 20: 500-505; Paul et al (2002) Nature Biotechnol 20: 505-508; Tuschl (2002) Nature Biotechnol 20: 15 440-448; Yu et al (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99: 6047-6052; McManus et al (2002) RNA 8:842-850; Sui et al (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99: 5515-5520; veja também Hannon (2002) Nature 418: 244-251.

A supressão, também conhecida como "silenciamento", é pre-dominantemente um evento pós-transcricional citoplásmico que é evolu-cionariamente conservado (veja Hutvagner e Zamore (2002) Curr Opin Genet Dev 12: 225-232). Modelos atuais sugerem que o dsRNA seja processado 20 em siRNA pela enzima RNAse III, Dicer. O siRNA, então, forma um comple-xo denominado complexo de silenciamento RNA-induzido (RISC). Esse complexo interage com o mRNA-alvo o qual é, então, clivado e degradado (Martinez et al (2002) Cell 110: 563-574; Schwarz et al (2002) Mol Cell 10: 25 537-548). shRNAs foram estudados em células de mamífero (Paul et al (2002) Genes & Dev 16: 948-958) e podem ser expressos eficazmente em células humanas (Sui et al (2002) Nature Biotechnol 20: 505-508). Uma tec-nologia de RNAi baseada em vetor de DNA para suprimir a expressão de gene 30 em células de mamífero é descrita por Yu e Turner ((2002) Proc Natl Acad Sci USA 99: 5515-5520). RNAi, através de expressão de siRNAs e s-hRNAs em células de mamífero, foi descrito por Yu et al ((2002) Proc Natl Acad Sci USA 99: 6047-6052).

A presente invenção inclui siRNAs, duplexes dos mesmos (isto é, dsRNAs), shRNAs e miRNAs, os quais interagem com (por exemplo, se ligam) uma sequência-alvo de mcl-1 (por exemplo, um mRNA de mcl-1 (por exemplo, um mRNA correspondendo às sequências de mcl-1 humano, tais como aquelas mostradas aqui). Tais ácidos nucleicos podem, por exemplo, ser oligonucleotídeos de RNA quimicamente sintetizados (veja Elbashir et al, supra). Sequências de RNAi exemplificativas abrangidas por e úteis na presente invenção incluem pelo menos uma das seguintes sequências ou sua sequência de fita complementar:

- 10 5' TTG GCT TTG TGT CCT TGG CG 3' (mcl-1, SEQ ID Nº: 7)
5' AAG AAA CGC GGU AAU CGG ACU 3' (mcl-1, SEQ ID Nº: 8);
5' AGU CCG AUU ACC GCG UUU CUU 3' (mcl-1, SEQ ID Nº: 9);
5' CUUACGCUGAGUACUUCGA3' (luciferase, SEQ ID Nº: 10);

Plasmídeos podem ser usados para transcrever shRNAs que podem funcionar como siRNAs (veja Sui et al (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99: 5515-5520; Brummelkamp et al (2002) Science 296: 550-553). Tais plasmídeos podem conter, por exemplo, um promotor de RNA polimerase II, seguido pela sequência que é transcrita em RNA contendo uma sequência senso, uma estrutura de loop e uma sequência antissenso. Uma variedade de loops tem sido empregada com sucesso, assim como vários promotores de polimeras III (Brummelkamp et al, Science 296: 550-553, 2002; Miyagishi e Taira, Nucl. Acids Res. 2: 113-114, 2002). Vetores (por exemplo, plasmídeos) operavelmente ligados a uma sequência que é transcrita em um RNA contendo uma sequência de mcl-1 "senso", uma estrutura de loop e a sequência de mcl-1 "antissenso" correspondente podem ser feitos usando procedimentos que são rotina na técnica. Uma vez que foi mostrado que siRNAs acionados por promotor U6 com quatro saliências 3' de uridina suprimem a expressão de um gene-alvo em células de mamífero (Paddison et al (2002) Nature Biotechnol 20: 497-500), vetores da presente invenção podem incluir um promotor U6 e sequências que são transcritas em siRNAs com saliências de uridina (por exemplo, 1-6 uridinas no 3' término). Um shRNA exemplificativo abrangido por e útil na presente invenção é descrito na seção

Exemplos, o qual é transcrito das sequências apresentadas aqui como SEQ ID NOs: 9 e 10, respectivamente (veja Tabela 1, abaixo).

Tipicamente, miRNAs são excisados de um loop-tronco de RNA precursor de aproximadamente 7- nucleotídeos (o shRNA), possivelmente através de uma enzima do tipo RNase III conhecida como Dicer ou um homólogo da mesma. Substituindo as sequências-tronco do precursor de miRNA pela sequência de miRNA complementar ao mRNA-alvo (aqui, um mRNA de mcl-1), uma estrutura de vetor que expressa o miRNA pode ser usada para produzir siRNAs para iniciar o RNAi contra o alvo em células de mamífero (Zeng, supra).

Os ácidos nucleicos da invenção podem ser incluídos em e expressos por vetores virais. Consequentemente, a invenção se caracteriza por vetores virais que induzem a silenciamento específico de mcl-1 através de expressão de siRNA. Por exemplo, vetores adenovirais mcl-1-específicos podem ser construídos através de geração de adenovírus recombinantes expressando siRNA sob controle de transcrição do promotor de RNA Pol II.

Um siRNA ou outro inibidor baseado em ácido nucleico pode ser administrado a animais e seres humanos usando qualquer método conhecido na técnica. Por exemplo, uma técnica de distribuição em "alta pressão" pode ser usada, tal como uma injeção rápida (por exemplo, uma injeção que está completa dentro de uns poucos segundos) de um grande volume de uma solução contendo siRNA no animal via uma artéria ou veia (veja, por exemplo, Lewis (2002) Nature Genetics 32: 107-108). Micropartículas, nanopartículas e lipossomas podem também ser usados para distribuir siRNAs. siRNAs que objetivam mRNA de mcl-1 e que estão associados a uma micropartícula, nanopartícula ou lipossoma ou que são, de outro modo, formulados para distribuição a uma célula biológica, estão dentro do escopo da presente invenção.

Uma molécula de dsRNA da presente invenção pode incluir cerca de 15 ou mais (por exemplo, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 ou mais) nucleotídeos em cada fita. As fitas do dsRNA podem ser substancialmente complementares a uma região-alvo do

mRNA de mcl-1. Por exemplo, uma fita pode ser cerca de 90% (por exemplo, cerca de 90%, 95% ou 100%) complementar a uma região-alvo de mRNA de mcl-1. A região-alvo pode ser qualquer região da sequência de ácido nucleico de mcl-1, por exemplo, uma região correspondendo aos nucleotídeos 1 a 228 de SEQ ID Nº: 1, por exemplo, dentro da região que codifica um polipeptídeo de aminoácidos 1 a 76 de SEQ ID Nº: 2.

Uma molécula de dsRNA da invenção pode ser produzida, por exemplo, através de síntese química da molécula, transcrição da molécula *in vitro* a partir de um *template* de DNA, fazendo a molécula *in vivo*, por exemplo, a partir de shRNA (geração de dsRNAs e outros ácidos nucleicos inibitórios é discutida ainda acima) ou usando qualquer outro método conhecido na técnica. Por exemplo, cada fita de um dsRNA pode ser quimicamente sintetizada usando nucleotídeos que ocorrem naturalmente ou nucleosídeos variadamente modificados projetados para aumentar a estabilidade biológica das moléculas ou aumentar a estabilidade física das moléculas ou aumentar a estabilidade física do duplex formado entre as fitas antissenso e senso do dsRNA (por exemplo, derivados de fosforotioato e nucleosídeos acridina-substituídos podem ser usados). O dsRNA pode também ser produzido usando um vetor de expressão no qual um ácido nucleico incluindo as sequências senso e antissenso na mesma fita foi clonado (por exemplo, um RNA transcrito a partir do ácido nucleico inserido pode formar uma hairpina, o tronco da qual forma um dsRNA que inclui uma fita antissenso que é complementar a um RNA de mcl-1). Consequentemente, pode-se fazer um dsRNA que inibe a expressão de mcl-1 através de geração (ou projeto) de um dsRNA que inclui uma sequência que é o reverso e o complemento de uma determinada sequência de mRNA de mcl-1.

O dsRNA pode ser testado em células expressando mcl-1. Um dsRNA anti-mcl-1 diminuirá a expressão de mcl-1 (isto é, diminuirá os níveis de proteína de mcl-1 e mRNA de mcl-1) nas células; expressão de mcl-1 pode ser ensaiada através de métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, os níveis de proteína de mcl-1 podem ser ensaiados através de análise por Western blot, através de imunoprecipitação, através de ELISA ou através de

um ensaio funcional. Os níveis de mRNA de mcl-1 podem ser ensaiados através de Northern blot, análise *in situ* ou transcrição inversa acoplada com reação em cadeia de polimerase (RT-PCR).

A invenção também abrange ribozimas. Ribozimas são moléculas de RNA catalíticas com atividade de ribonuclease que são capazes de clivar um ácido nucleico fita simples (por exemplo, mRNA) ao qual elas têm uma região complementar. Assim, ribozimas (por exemplo, ribozimas do tipo "hammerhead" (descritas em Haselhoff e Gerlach (1988) Nature 334: 585 591)) podem ser usadas para clivar cataliticamente transcritos de mRNA de mcl-1, desse modo, inibindo a tradução de mRNA de mcl-1. Uma ribozima tendo especificidade por um ácido nucleico que codifica mcl-1 pode ser projetada baseado na sequência de nucleotídeo de um cDNA de mcl-1 divulgado aqui. Por exemplo, um derivado de um RNA de Tetrahymena L 19 IVS pode ser construído, no qual a sequência de nucleotídeo do sítio ativo é complementar à sequência de nucleotídeo a ser clivada em um mRNA que codifica mcl-1. Veja, por exemplo, Cech et al, Patente U.S. Nº 4.987.071; e Cech et al, Patente U.S. Nº 5.116.742. Alternativamente, mRNA de mcl-1 pode usado para selecionar um RNA catalítico tendo uma atividade de ribonuclease específica de um reservatório de moléculas de RNA. Veja, por exemplo, Bartel e Szostak (1993) Science 261: 1411 1418.

A invenção também abrange moléculas de ácido nucleico que formam estruturas helicoidais triplas. Por exemplo, expressão do gene de mcl-1 pode ser inibida através de objetivação de sequências de nucleotídeo complementares a uma região regulatória do gene de mcl-1 (por exemplo, o promotor e/ou intensificadores de mcl-1) para formar estruturas helicoidais triplas que impedem a transcrição do gene de mcl-1 em células-alvo. Veja, de modo geral, Helene (1991) Anticancer Drug Des. 6(6): 569 84; Helene (1992) Ann. N.Y. Acad. Sci. 660: 27-36; e Maher (1992) Bioassays 14(12): 807-15.

Em determinadas modalidades, as moléculas de ácido nucleico da invenção são modificadas na porção de base, porção de açúcar ou parte principal de fosfato para melhorar, por exemplo, a estabilidade, hibridização

ou solubilização da molécula. Por exemplo, a parte principal de desóxirribose fosfato dos ácidos nucleicos pode ser modificada para gerar ácidos nucleicos peptídicos (veja Hyrup et al (1996) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 4(1): 5-23). Conforme usado aqui, os termos "ácidos nucleicos peptídicos" 5 ou "PNAs" se referem a mímicos de ácido nucleico, por exemplo, mímicos de DNA, nos quais a parte principal de desóxirribose fosfato é substituída por uma parte principal pseudopeptídica e apenas as quatro nucleobases naturais são retidas. Foi mostrado que a parte principal neutra dos PNAs permite hibridização específica ao DNA e RNA sob condições de baixa resistência iônica. A síntese de oligômeros de PNA pode ser realizada usando protocolos de síntese de peptídeo em fase sólida padrão, conforme descrito em Hyrup et al (1996) supra; Perry O'Keefe et al (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14670-675.

Na presente invenção, PNAs de mcl-1 podem ser usados para 15 aplicações terapêuticas e diagnósticas. Por exemplo, PNAs podem ser usados como agentes antissenso ou antigênicos para modulação sequêncial- 20 específica de expressão de gene, por exemplo, através de indução de transcrição ou interrupção de tradução ou inibição de replicação do gene; PNAs de mcl-1 podem também ser usados, por exemplo, na análise de mutações 25 de um único par de base em um gene, por exemplo, Clampeamento de PCR PNA-dirigida; como enzimas de restrição artificiais quando usadas em combinação com outras enzimas, por exemplo, SI nucleases (Hyrup (1996) supra); ou como sondas ou iniciadores para sequência de DNA e hibridização (Hyrup (1996) supra; Perry O'Keefe et al (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14670-675).

Em outra modalidade, PNAs de mcl-1 podem ser modificados, 30 por exemplo, para intensificar sua estabilidade ou captação celular, através de fixação de grupos lipofílicos ou outros auxiliares ao PNA, através da formação de quimeras de DNA/PNA ou através do uso de lipossomas ou outros métodos de distribuição de fármaco conhecidos na técnica. Por exemplo, quimeras de DNA/PNA de mcl-1 podem ser geradas, as quais podem combinar as propriedades vantajosas de PNA e DNA. Tais quimeras permitem

que enzimas de reconhecimento de DNA, por exemplo, RNase H e DNA polimerases, interajam com a porção de DNA, enquanto que a porção de PNA proporciona alta afinidade e especificidade de ligação. Quimeras de PNA/DNA podem ser ligadas usando ligantes de comprimentos apropriados

5 selecionados em termos de empilhamento de base, número de ligações entre as nucleobases e orientação (Hyrup (1996) supra). A síntese de quimeras de DNA/PNA pode ser realizada conforme descrito em Hyrup (1996) supra e Finn et al (1996) Nucleic Acids Research 24(17): 3357-63. Por exemplo, uma cadeia de DNA pode ser sintetizada sobre um suporte sólido usando química

10 padrão de acoplamento com fosforamidita e análogos de nucleosídeo modificados, por exemplo, 5'-(4 metoxitritil)amino-5'-desóxi timidina fosforamidita, podem ser usados como um ligante entre o PNA e a extremidade 5' do DNA (Mag et al (1989) Nucleic Acid Res. 17: 5973 88). Monômeros de PNA são, então, acoplados de uma maneira gradual para produzir uma molécula quimérica com um segmento de PNA 5' e um segmento de DNA 3' (Finn et al

15 (1996) Nucleic Acids Research 24(17): 3357 63). Alternativamente, moléculas químicas podem ser sintetizadas com um segmento de DNA 5' e um segmento de PNA 3' (Peterser et al (1975) Bioorganic Med. Chem. Lett. 5: 1119-1124).

20 Em outras modalidades, o oligonucleotídeo pode incluir outros grupos pendentes, tais como peptídeos (por exemplo, para objetivação de receptores na célula hospedeira *in vivo*) ou agentes que facilitam o transporte através da membrana celular (veja, por exemplo, Letsinger et al (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6553 6556; Lemaitre et al (1987) Proc. Natl.

25 Acad. Sci. USA 84: 648 652; Publicação PCT Nº WO 88/09810) ou a barreira sangue/cérebro (veja, por exemplo, Publicação PCT Nº WO 89/10134). Além disso, oligonucleotídeos podem ser modificados com agentes de clivagem disparados por hibridização (veja, por exemplo, Krol et al (1988) Bio/Techniques 6: 958-976) ou agentes de intercalação (veja, por exemplo,

30 Zon (1988) Pharm. Res. 5: 539-549). Para essa finalidade, o oligonucleotídeo pode ser conjugado à outra molécula, por exemplo, um peptídeo, agente de ligação cruzada disparada por hibridização, agente de transporte ou a-

gente de clivagem disparada por hibridização.

Vetores, células hospedeiras e animais transgênicos

Também incluídos na presente invenção são vetores, por exemplo, vetores de expressão, contendo um ácido nucleico de mcl-1 (ou uma porção do mesmo). Conforme usado aqui, o termo "vetor" se refere a uma molécula de ácido nucleico capaz de transportar outro ácido nucleico ao qual ela tenha sido ligada. Um tipo de vetor é um plasmídeo, isto é, um loop de DNA fita dupla circulação no qual segmentos de DNA adicionais podem ser ligados. Outro tipo é um vetor viral, em que segmentos de DNA adicionais podem ser ligados no genoma viral. Determinados vetores são capazes de replicação autônoma em uma célula hospedeira na qual eles são introduzidos. Portanto, também incluídas na invenção, são células hospedeiras contendo o vetor contendo ácido nucleico de mcl-1. A escolha do vetor e célula hospedeira é rotina para aqueles versados na técnica.

A presente invenção proporciona um método de tratamento de síndromes mielodisplásicas, linfomas e leucemias, em particular mastocitose sistêmica e também leucemia mielóide aguda (AML) e também tumores sólidos tais como, por exemplo, câncer cólon-retal (CRC) e câncer de pulmão de células não-pequenas (NSCLC) compreendendo administração a um mamífero que precisa de tal tratamento, uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma combinação de um inibidor de quinase FLT-3 e um inibidor de mcl-1, tal como um oligonucleotídeo antissenso ou uma estrutura de RNAi mcl-1-específica, cada um na forma livre ou na forma de um sal farmaceuticamente aceitável ou pró-fármaco, respectivamente.

De preferência, a presente invenção proporciona um método para o tratamento de mamífero, especialmente seres humanos, que sofrem de síndromes mielodisplásicas, linfomas e leucemias, em particular mastocitose sistêmica e também leucemia mielóide aguda (AML) e também tumores sólidos tais como, por exemplo, câncer cólon-retal (CRC) e câncer de pulmão de células não-pequenas (NSCLC) compreendendo administração, a um mamífero que precisa de tal tratamento, uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma combinação de *N*-(9S,10R,11R,13R)-2,3,10,11,12,13-

hexahidro-10-metóxi-9-metil-1-oxo-9,13-epóxi-1H,9H-di-indolo[1,2,3-
gh:3',2',1'-lm]pirrolo[3,4-j][1,7]benzodiazonin-11-il]-N-metilbenzamida da fór-
mula (VII) ou um sal farmaceuticamente aceitável da mesma e um oligonu-
cleotídeo antissenso ou uma estrutura de RNAi mcl-1-específica.

5 Em outra modalidade, a presente invenção se refere ao uso de
uma combinação de um inibidor de quinase FLT-3 e um oligonucleotídeo
antissenso ou uma estrutura de mcl-1-específica para o tratamento de sín-
dromes mielodisplásicas, linfomas e leucemias, em particular mastocitose
sistêmica e também leucemia mielóide aguda (AML) e também tumores sóli-
dos tais como, por exemplo, câncer cólon-retal (CRC) e câncer de pulmão
de células não-pequenas (NSCLC).

10 Em uma outra modalidade, a presente invenção se refere ao uso
de uma combinação de um inibidor de quinase FLT-3 e um oligonucleotídeo
antissenso ou uma estrutura de RNAi mcl-1-específica para o preparo de
15 uma composição farmacêutica para o tratamento de síndromes mielodisplásicas,
linfomas e leucemias, em particular mastocitose sistêmica e também
leucemia mielóide aguda (AML) e também tumores sólidos tais como, por
exemplo, câncer cólon-retal (CRC) e câncer de pulmão de células não-
pequenas (NSCLC).

20 De acordo com a invenção, uma combinação de *N*-
[(9S,10R,11R,13R)-2,3,10,11,12,13-hexahidro-10-metóxi-9-metil-1-oxo-9,13-
epóxi-1H,9H-di-indolo[1,2,3-gh:3',2',1'-lm]pirrolo[3,4-j][1,7]benzodiazonin-11-
il]-N-metilbenzamida da fórmula (VII) ou um sal farmaceuticamente aceitável
da mesma e um oligonucleotídeo antissenso ou uma estrutura de RNAi mcl-
25 1-específica são as combinações preferidas de um inibidor de quinase FLT-3
e um oligonucleotídeo antissenso ou uma estrutura de RNAi mcl-1-
específica.

Abreviações:

ASO	Oligonucleotídeo(s) antissenso
ASM	Mastocitose sistêmica agressiva
BM	Medula óssea
BSA	Albumina de soro bovino

cladribina	2-clorodesoxiadenosina (=2CdA)
FCS	Soro fetal de bezerro
ISM	Mastocitose sistêmica indolente
MC	Mastócito(s)
MCL	Leucemia de mastócitos
Mcl-1	Leucemia de células mielóides 1
MCS	Sarcoma de mastócitos
miRNA	micro RNA
PB	Sangue periférico
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
RNAi	RNA de interferência
RT-PCR	Reação em cadeia de polimerase-transcriptase reversa
shRNA	RNA de hairpina curto
siRNA	RNA de interferência curto
SM	Mastocitose sistêmica
SSM	Mastocitose sistêmica "smouldering"
TK	tirosina quinase

A combinação de um inibidor de quinase FLT-3 e um oligonucleotídeo antissenso ou uma estrutura de RNAi mcl-1-específica pode estar na forma livre ou na forma de um sal farmaceuticamente aceitável ou pró-fármaco, respectivamente, para tratamento de síndromes mielodisplásicas,

- 5 linfomas e leucemias, em particular mastocitose sistêmica e também leucemia mielóide aguda (AML) e também tumores sólidos tais como, por exemplo, câncer cólon-retal (CRC) e câncer de pulmão de células não-pequenas (NSCLC) pode ser uma combinação livre ou fixa dos parceiros de combinação.

- 10 Em um aspecto, a presente invenção também se refere a uma combinação, tal como uma preparação combinada ou uma composição farmacêutica, a qual compreende (a) um inibidor de FLT-3, especialmente os inibidores de FLT-3 especificamente mencionados aqui antes, em particular aqueles mencionados como sendo preferidos e (b) um oligonucleotídeo antissenso ou uma estrutura de RNAi mcl-1-específica, na qual os ingredientes
15

ativos (a) e (b) estão presentes, em cada caso, na forma livre ou na forma de um sal farmaceuticamente aceitável ou formulação biofarmacêutica adequada para uso simultâneo, concorrente, separado ou sequencial. Formulações biofarmacêuticas adequadas são conhecidas por aqueles versados na técnica, em que a formulação é otimizada, dependendo se a administração terapêutica é de um constructo de RNAi ou para um constructo de oligonucleotídeo antissenso.

O termo "uma preparação combinada" define especialmente um "kit de partes" no sentido de que os parceiros de combinação (a) e (b), conforme definido acima, podem ser dosados independentemente ou através do uso de diferentes combinações fixas com quantidades distintas dos parceiros de combinação (a) e (b), isto é, simultânea, concorrente, separada ou sequencialmente. As partes do kit de partes podem, então, por exemplo, ser administradas simultânea ou cronologicamente, isto é, em diferentes pontos de tempo e com intervalos de tempo iguais ou diferentes para qualquer parte do kit de partes. A proporção das quantidades totais do parceiro de combinação (a) para o parceiro de combinação (b) a serem administrados na preparação combinada pode ser variada, por exemplo, de forma a ir de encontro às necessidades de uma sub-população de pacientes a ser tratada ou às necessidades de um único paciente, necessidades diferentes as quais podem ser em virtude da doença em particular, gravidade da doença, idade, sexo, peso corporal, etc. dos pacientes.

Conforme mencionado acima, a dosagem precisa do inibidor de FLT-3 e do oligonucleotídeo antissenso ou uma estrutura de RNAi mcl-1-25 específica a ser empregada para tratamento das doenças e condições mencionadas aqui antes depende de vários fatores, incluindo o hospedeiro, a natureza e a gravidade da condição que está sendo tratada, o modo de administração. Contudo, em geral, resultados satisfatórios são obtidos quando o inibidor de FLT-3 é administrado parenteralmente, por exemplo, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutânea, intratumoral ou retalmente ou enteralmente, por exemplo, oralmente, de preferência intravenosamente ou, de preferência, oralmente, intravenosamente em uma dosagem diária de

0,1 a 10 mg/kg de peso corporal, de preferência 1 a 5 mg/kg de peso corporal. Em experimentos com seres humanos, uma dose total de 225 mg/dia é, mais presumivelmente, a Dose Máxima Tolerada (MTD). Uma dosagem diária intravenosa preferida é 0,1 a 10 mg/kg de peso corporal ou, para primatas maiores, uma dosagem diária de 200-300 mg. Uma dose intravenosa típica é de 3 a 5 mg/kg, três a cinco vezes por semana.

5 Mais preferivelmente, os inibidores de FLT-3, especialmente MIDOSTAURINA, são administrados oralmente, através de formas de dosagem tais como microemulsões, géis macios ou dispersões sólidas em dosagens de até cerca de 250 mg/dia, em particular 225 mg/dia, administradas uma, duas ou três vezes ao dia.

10 Usualmente, uma pequena dose é administrada inicialmente e a dosagem é gradualmente aumentada até que a dosagem ótima para o hospedeiro sob tratamento seja determinada. O limite máximo de dosagem é aquele imposto pelos efeitos colaterais e pode ser determinado através de 15 experimentação para o hospedeiro que está sendo tratado.

20 Os inibidores de FLT-3, o oligonucleotídeo antissenso ou uma estrutura de RNAi mcl-1-específica podem ser combinados com um ou mais veículos farmaceuticamente aceitáveis e, opcionalmente, um ou mais de outros adjuvantes farmacêuticos convencionais e administrados enteralmente, por exemplo, oralmente, na forma de comprimidos, cápsulas, caplets, etc. ou parenteralmente, por exemplo, intraperitoneal ou intravenosamente, na forma de soluções ou suspensões injetáveis estéreis. As composições enterais e parenterais podem ser preparadas através de meios convencionais.

25 As soluções para infusão de acordo com a presente invenção são, de preferência, estéreis. Isso pode ser prontamente obtido, por meio de filtração através de membranas de filtração estéreis. Formação asséptica de qualquer composição na forma líquida, o enchimento asséptico de frascos e/ou combinação de uma composição farmacêutica da presente invenção 30 com um diluente adequado sob condições assépticas são bem conhecidos por aqueles versados.

Os inibidores de FLT-3 e um oligonucleotídeo antissenso ou um

constructo de RNAi mcl-1-específico pode ser formulado em composições farmacêuticas enterais e parenterais contendo uma quantidade da substância ativa que é eficaz para tratamento de doenças e condições mencionadas aqui antes, tais composições na forma de dosagem unitária e tais composições compreendendo um veículo farmaceuticamente aceitável.

5 Exemplos de composições úteis de inibidores de FLT-3 são descritos nas patentes Européias Nº 0 296 110, Nº 0 657 164, Nº 0 296 110, Nº 0 733 372, Nº 0 711 556, Nº 0 711 557.

10 As composições preferidas de inibidores de FLT-3 são descritas na patente Européia Nº 0 657 164 publicada em 14 de Junho de 1995. As composições farmacêuticas descritas compreendem uma solução ou dispersão de compostos de fórmula I, tal como MIDOSTAURINA, um glicerídeo de polialquíleno glicol saturado é uma mistura de glicerila e polietileno glicol ésteres de um ou mais C₈-C₁₈ ácidos graxos saturados.

15 Dois processos de fabricação de tais composições de inibidores de FLT-3 são descritos aqui depois.

Composição A:

20 Gelucire 44/14 (82 partes) é fundida através de aquecimento para 60° C. MIDOSTAURINA em pó (18 partes) é adicionada ao material fundido. A mistura resultante é homogeneizada e a dispersão obtida é introduzida em cápsulas de gelatina dura de diferentes tamanhos, de modo que algumas contenham uma dosagem de 25 mg e outras uma dosagem de 75 mg da MIDOSTAURINA. As cápsulas resultantes são adequadas para administração oral.

25 **Composição B:**

Gelucire 44/14 (86 partes) é fundido através de aquecimento para 60° C. MIDOSTAURINA em pó (14 partes) é adicionada ao material fundido. A mistura é homogeneizada e a dispersão obtida é introduzida em cápsulas de gelatina dura de diferentes tamanhos, de modo que algumas 30 contenham uma dosagem de 25 mg e outras uma dosagem de 75 mg da MIDOSTAURINA. As cápsulas resultantes são adequadas para administração oral.

Gelucire 44/14 comercialmente disponível da Gattefossé é uma mistura de ésteres de C8-C18 ácidos graxos saturados com glicerol e um polietileno glicol tendo um peso molecular de cerca de 1500, as especificações para a composição do componente de ácido graxo sendo, em peso, 4-5 10% de ácido caprílico, 3-9% de ácido cáprico, 40-50% de ácido láurico, 14-24% de ácido mirístico, 4-14% de ácido palmítico e 5-15% de ácido esteárico.

Um exemplo preferido de formulação de Gelucire consiste em:

Gelucire (44/14): 47 g

10 MIDOSTAURINA: 3,0 g enchida em um frasco Twist de 60 mL

Um exemplo preferido de gel macio conterá a seguinte microemulsão:

Glicerídeos de óleo de milho	85,0 mg
Polietilenoglicol 400	128,25 mg
Cremophor RH 40	213,75 mg
MIDOSTAURINA	25,0 mg
DL alfa Tocoferol	0,5 mg
Etanol absoluto	33,9 mg
Total	486,4 mg

Contudo, deve ser claramente entendido que isso é para fins de ilustração apenas.

15 Pode ser mostrado, através dos métodos de teste descritos abaixo, que a combinação de um inibidor de FLT-3 e um oligonucleotídeo antissenso de mcl-1 ou um constructo de RNAi mcl-1-específica é mais eficaz do que tratamento com qualquer um dos agentes sozinhos. Nesses estudos, determinados efeitos sobre o ciclo celular e apoptose induzida por um oligo-20 nucleotídeo antissenso ou um constructo de RNAi mcl-1-específico e um inibidor de quinase FLT-3, de preferência 4-benzil estaurosporina, contra mastocitose sistêmica (SM) são demonstrados.

A expressão e o papel funcional de Mcl-1 em MCs neoplásicos humanos são examinados. Pode ser mostrado que MCs neoplásicos primários em todas as variantes de SM, incluindo ASM e MCL, bem como a linha-

gem de células de MCL HMC-1, expressa Mcl-1 de uma maneira constitutiva. Além disso, é mostrado que objetivação de Mcl-1 nessas células está associada a crescimento reduzido e indução de apoptose e a uma sensibilidade aumentada a inibidores de TK, incluindo PKC412, 4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-N-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)fenil] benzamida e imatinib.

Um ensaio de citometria de fluxo recentemente desenvolvido (FCM), utilizando anticorpo anti-FLT-3 ou fosfo (p)-FLT-3, é usado para demonstrar que, enquanto células MV4-11 (MV) expressam FLT-3 e p-FLT-3, células RS4-11 (RS) expressam apenas FLT-3 sobre sua superfície celular. Exposição a 20 a 200 nM de um inibidor de FLT-3 preferido induz a acúmulo em fase G1 do ciclo celular e, de uma maneira dose-dependente, significativamente mais apoptose de células MV do que RS. Isso está associado a uma atenuação acentuada dos níveis de p-FLT-3, p-AKT e p-ERK1/2, mas não de FLT-3, AKT ou ERK1/2, conforme determinado através de análises de Western. O inibidor de FLT-3 preferido também inibe a expressão, na superfície, de p-FLT-3, mas não de FLT-3 (conforme pode ser determinado através de FCM) sobre células MV. Em contraste ao inibidor de FLT-3 preferido, tratamento com um composto HDAI preferido atenua os níveis de FLT-3 e p-FLT-3 de uma maneira dose-dependente em células MV e RS, conforme pode ser determinado através de análise de Western e FCM. Exposição a um composto HDAI preferido (20 a 100 nM) também sub-regula os níveis de p-FLT-3, p-AKT e p-ERK1/2. Significativamente, cotratamento com um inibidor de FLT-3 preferido e um composto HDAI preferido induz, surpreendentemente, à apoptose de células MV e RS. Isso está associado a uma maior atenuação de p-FLT-3, p-AKT e p-ERK1/2 em células MV.

De preferência, há pelo menos um efeito benéfico, por exemplo, uma intensificação mútua dos primeiro e segundo ingredientes ativos, em particular um sinergismo, por exemplo, mais do que um efeito aditivo, efeitos vantajosos adicionais, menos efeitos colaterais, um efeito terapêutico combinado em uma dosagem de outro modo não eficaz de um ou ambos dos primeiro e segundo ingredientes ativos e, especialmente, um forte sinergismo

dos ingredientes ativos.

A proporção molar de inibidor de FLT-3/um oligonucleotídeo antissenso ou um constructo de RNAi mcl-1-específico na combinação é geralmente de 1/10 a 10/1, de preferência de 1/5 a 5/1, por exemplo, 1/1, 2/1 ou 3/1.

Exemplo 1

Materiais e Métodos

Reagentes

Imatinib (ST1571), PKC41228 e nilotinib (4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-N-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)fenil] benzamida) 29 são proporcionados pela Novartis Pharma AG (Basel, Suíça). Soluções de estoque de PKC412 e 4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-N-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)fenil] benzamida são preparadas através de dissolução em sulfóxido de dimetila (DMSO; Merck, Darmstadt, Alemanha). Interleucina-4 (IL-4) é adquirida da Peprotech (Rocky Hill, NJ), meio RPMI 1640 e soro fetal de bezerro (FCS) da PAA Laboratories (Pasching, Áustria), L-glutamina e meio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM) da Gibco Life Technologies (Gaithersburg, MD), ³H-timidina da Amersham (Aylesbury, Reino Unido) e claribina (2-clorodesoxiadenosina, 2CdA) da Janssen-Cilag (Beerse, Bélgica). Oligonucleotídeos antissenso (ASO; projetados de acordo com sequências recentemente publicadas) são obtidas da VBC Genomics (Viena, Áustria) ou ISIS Pharmaceuticals (Carlsbad, CA) e siRNA da Dharmacron (Lafayette, CO).

Características de paciente e purificação de mastócitos neoplásicos

Um número total de 25 pacientes com mastocitose sistêmica (mastocitose sistêmica indolente, ISM, n = 17; mastocitose sistêmica agressiva, ASM, n = 3; leucêmica de mastócitos, MCL, n = 2; mastocitose sistêmica "smouldering", SSM, n = 2; sarcoma de mastócitos, MCS, n = 1) são examinados. Células de medula óssea (BM) são obtidas da crista ilíaca posterior e coletadas em seringas contendo heparina isenta de conservante. Em cada caso, consentimento informado é obtido antes de biópsia. Os diagnósticos são estabelecidos de acordo com os critérios da OMS. Em dois pacientes

- tes com leucemia de mastócitos (MCL) e um com sarcoma de mastócitos (MCS), MCs neoplásicos primários são purificados até homogeneidade (pureza >98%) usando mAb PE-rotulado YB5.B8 (Pharmingen, San Diego, CA) e um selecionador de células FACS-Vantage (Becton Dickinson, San Jose, CA) conforme descrito. Todos os experimentos são conduzidos com aprovação pelo quadro de revisão institucional e de acordo com a declaração de Helsinki.

Cultura de células HMC-1 exibindo ou carecendo de KIT D816V

A linhagem de mastócitos humanos HMC-1 gerada a partir de células leucêmicas em um paciente com MCL48 é obtida (Mayo Clinic, Rochester, MN). Dois subclones de HMC-1 são usados, isto é, HMC-1.1 abrigando a mutação *KIT* G560V mas não D816V e células HMC-1.2 exibindo a mutação G560V e a mutação D816V de *KIT*. 32 células HMC-1 são crescidas em meio IMDM suplementado com FCS a 10%, 1-glutamina e antibióticos a 37°C e 5% de CO₂. Células HMC-1 são recongeladas a partir de um estoque original a cada 4 a 8 semanas e sofrem passes semanais. Como controle de "estabilidade fenotípica", células HMC-1 são periodicamente verificadas com relação à expressão de *KIT* e o efeito de sub-regulação de IL-4 (100 U/ml, 48 horas).

20 Tratamento com inibidores

Células HMC-1 são incubadas com várias concentrações do inibidor de TK de objetivação a *KIT* D816V PKC412 (100 pM a 10 μM), várias concentrações de 4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-N-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)fenil] benzamida (1 nM a 100 μM), imatinib (3 nM a 300 μM), 2CdA (0,1 - 10.000 ng/mL) ou meio de controle a 37°C e 5% de CO₂ durante até 48 horas. Em um conjunto separado de experimentos, células HMC-1 transfectadas com ASO mcl-1-específico antes de serem expostas a fármacos inibitórios (veja abaixo). Em outros experimentos, as células são transfectadas com várias concentrações de ASO Mcl-1-específico (50 nM - 250 nM) durante até 12 horas ou com siRNA (200 nM) durante 12 horas sem exposição adicional aos fármacos objetivados. Após exposição aos fármacos e/ou ASO, as células são submetidas a experimen-

tos de captação de ^3H -timidina, análise de viabilidade celular e apoptose ou Western blotting.

Análise por Northern blot e RT-PCR

RNA total é isolado de células HMC-1 usando Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acordo com as instruções do fabricante. Preparação de RNA e Northern blotting são realizados essencialmente conforme descrito. Em suma, 15 µg de RNA total são fracionados sobre géis de formaldeído-agarose a 1,0% e transferidos para membranas de náilon (Hybond N, Amersham, Aylesbury, Reino Unido) conforme descrito. Hibridização é realizada em tampão "Rapid-hyb" (Amersham) usando cDNAs ^{32}P -rotulados específicos para mcl-1 ou β -actina. A sonda de mcl-1 é gerada através de excisão do cDNA de mcl-1 de comprimento total de pBSK-Mcl-1 (uma cortesia de Stanley J. Korsmeyer, Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA) com EcoRI e XbaI (New England Biolabs, Beverly, MA) conforme descrito. Rotulação é realizada usando o kit Megaprime (Amersham). As blots são lavadas em 0,2 x SSC (1 x SSC = NaCl a 150 mM e citrato de sódio a 15 mM, pH de 7,0) com dodecil sulfato de sódio a 0,1% (SDS) durante 1 hora a 42°C durante 2 x 30 minutos e a 62°C durante mais 30 minutos. A radioatividade ligada é visualizada através de exposição a um filme Biomax MS (Kodak, Rochester, NY) a -80°C usando telas de intensificação (Kodak). Os níveis de expressão de mRNA são quantificados através de densitometria de auto-radiogramas usando o software E.A.S.Y. Win32 (Herolab, Wiesloch, Alemanha). Reações de RT-PCR são realizadas usando o kit Protoscript First Strand cDNA Synthesis (New England Biolabs, Beverly, MA) usando 1 µg de RNA em um volume de reação de 50 µL. As condições de PCR são como segue: desnaturação inicial a 94°C durante 60 segundos, anelamento a 55°C durante 60 segundos, polimerização a 72°C durante 60 segundos (35 ciclos) e extensão terminal a 72°C durante 10 minutos. Os seguintes pares de iniciador são usados: mcl-1: 5'-TGC TGG AGT TGG TCG GGG AA-3' (dianteiro) (SEQ ID Nº: 3) e 5'-TCG TAA GGT CTC CAG CGC CT-3' (reverso) (SEQ ID Nº: 4). β -actina: 5'-ATG GAT GAT GAT ATC GCC GCG-3' (dianteiro) (SEQ ID Nº:5) e 5'-CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT GGA GGG GCC-3' (reverso)

(SEQ ID Nº:6). Os produtos de PCR são decompostos em géis de agarose a 1% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio.

Análise por Western blot

Análise por Western blot é realizada conforme previamente descrito usando lisatos de células HMC-1 um anticorpo policlonal anti-Mcl-1 humana de coelho (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Em suma, as células são submetidas à lise em solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo Triton-X a 1% (Sigma, St. Louis, MO). As proteínas são separadas sob condições de redução através de eletroforese em SDS-gel de poliacrilamida e transferidas para membranas de nitrocelulose (Protran, Schleicher & Schuell, Dassel, Alemanha) em tampão de transferência. As membranas são, então, expostas a IgG anticomundongo/anticoelho (BM Chemiluminescence Western blotting Kit, Roche). Para confirmar carregamento igual, as membranas são re-hibridizadas com um anticorpo anti-β-actina (Sigma). Quimioluminescência é detectada através de exposição a um filme Biomax MS (Kodak).

Imuno-histoquímica e imunocitoquímica

Em todos os pacientes com SM, a expressão de Mcl-1 em MCs neoplásicos de BM é examinada sobre seções seriais (2 µm) preparadas a partir de espécimes de BM incrustadas em parafina, formalina-fixadas usando a técnica de coloração indireta com imunoperoxidase. Peroxidase endógena é bloqueada com CH₃OH/H₂O₂. Antes de coloração com um anticorpo anti-Mcl-1 policlonal (Santa Cruz) (diluição de trabalho: 1:50), seções de BM são pré-tratadas em um forno de microondas. Seções de BM seriais são incubadas com o anticorpo anti-Mcl-1 (durante a noite) e o anticorpo antitriptase G3 (diluição de trabalho: 1:5.000 durante uma hora em temperatura ambiente) (Chemicon, Temecula, CA). Os anticorpos são diluídos em solução salina tamponada com Tris a 0,05 M (TBS, pH de 7,5) e albumina de soro bovino a 1% (BSA, Sigma). Após lavagem, as lâminas são incubadas com IgG anticomundongo de cavalo ou anticoelho de cabra biotinilada durante 30 minutos, lavadas e expostas ao complexo de estreptavidina-biotina-peroxidase durante 30 minutos. 3-amino-9-etil-carbazol (AEC) é usado como

cromogênio. As lâminas são contracoradas em Mayer's Hemalaun. Imunocitoquímica é realizada sobre preparações em Citospina de células HMC-1 conforme descrito usando anticorpo anti-Mcl-1 (diluição de trabalho de 1:200) e IgG anticoelho de cabra biotinilada (Biocarta, San Diego, CA). Em 5 experimentos selecionados, um peptídeo de bloqueio de Mcl-1 (Santa Cruz) é aplicado (diluição de trabalho de 1:40). Como cromogênio, complexo de fosfatase alcalina (Biocarta) é usado. A reatividade com o anticorpo é tornada visível usando Neofuchsina (Nichirei, Tóquio, Japão).

Transfecção de oligonucleotídeos antisenso (ASO) e siRNA de mcl-1

10 Células HMC-1.1 e HMC-1.2 são transfectadas com um ASO de fosforotioato quimérico de 2'-O-metoxietil/2'-desoxinucleotídeo mcl-1-específico (5'-TTG GCT TTG TGT CCT TGG CG-3') (SEQ ID Nº: 7) ou com um reservatório de oligonucleotídeo de controle misturado. O controle misturado representa uma mistura de bases A 15 (adenina), G (guanina), T (timina) e C (citosina), a preparação resultante contendo uma mistura equimolar de oligonucleotídeos. Em um conjunto de experimentos separado, um siRNA de mcl-1 fita dupla anelado, purificado e dessalinizado (AAG AAA CGC GGU AAU CGG ACU) (SEQ ID Nº: 8) e AGU CCG AUU ACC GCG UUU CUU 3' (mcl1, SEQ ID Nº: 9)) e um siRNA de 20 controle contra luciferase (CUU ACG CUG AGU ACU UCG A) (SEQ ID Nº: 10), ambos obtidos da Dharmacon (Lafayette, CO), são aplicados. Para transfecção, 800.000 células são vedadas em lâminas de cultura de 75 cm² a 37°C durante 24 horas. Mcl-1-ASO e siRNA de Mcl-1 são transformados em complexo com Regente Lipofectina (Invitrogen) em meio RPMI 1640 es- 25 sencialmente conforme descrito. Em suma, células HMC-1.1 ou HMC-1.2 são incubadas com várias concentrações de ASO de mcl-1 (50-250 nM) ou siRNA mcl-1-específico a 200 nM a 37°C durante 4 horas. Após exposição ao ASO, as células são lavadas e cultivadas em meio RPMI 1640 com FCS a 10% na presença ou ausência de várias concentrações de inibidores de 30 TK durante mais 12 horas, antes de serem analisadas. Células tratadas com siRNA são mantidas em meio de controle durante 12 horas (sem inibidores de TK) antes de serem examinadas com relação ao percentual de células

apoptóticas e Western blotting.

Ensaio de incorporação de ^3H -timidina e determinação de viabilidade celular

Para investigar os efeitos antiproliferativos de ASO de Mcl-1, 5 PKC412, 4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-N-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)fenil] benzamida, imatinib e 2CdA, experimentos de incorporação de ^3H -timidina são conduzidos usando células HMC-1.1 e células HMC-1.2. Inibidores de TK e 2CdA são aplicados à células não tratadas ou células 10 transfectadas com ASO ou controle universal (misturado). Em particular, 4 horas após transfecção com ASO de Mcl-1 ou oligonucleotídeos de controle, as células são cultivadas em lâminas de microtitulação com 96 cavidades (5×10^4 células por cavidade) na ausência ou na presença de várias concentrações de PKC412 (100 pM a 10 μM), 4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-N-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)fenil] benzamida (1 nM a 100 μM), imatinib (3 nM a 300 μM) ou cladribina (2CdA; HMC-1.1: 0,1 - 10.000 ng/mL; HMC-1.2: 0,5 - 500 ng/mL) durante 24 horas. Após 15 o que, 1 μCi de ^3H -timidina é adicionado a cada cavidade. Dezesseis horas depois, as células são coletadas sobre membranas com filtro (Packard Bioscience, Meriden, CT) em um coletor Filtermate 196 (Packard Bioscience). Os filtros são, então, secos ao ar e a radioatividade ligada é medida em um contador β (Top-Count NXT, Packard Bioscience). Todos os experimentos são realizados em triplicata. A viabilidade celular é determinada através do teste 20 de exclusão com azul de tripano. O percentual de células apoptóticas é determinado com lâminas de Citospina coradas com Wright-Giemsa empregando critérios citomorfológicos convencionais. 25

Análise estatística

Para determinar o nível de significância em diferenças encontradas na avaliação dos dados, o t-teste de Student emparelhado é aplicado.

30 Os resultados são considerados como sendo significativamente diferentes com $p < 0,05$. Para determinar os efeitos sinergísticos de ASO de mcl-1 e fármacos objetivados, os valores de índice de combinação são calculados de

acordo com diretrizes publicadas usando um software comercialmente disponível (Calcusyn; Biosoft, Ferguson, MO).

Resultados

Detecção da proteína Mcl-1 em mastócitos neoplásicos

5 **MÉTODO:** Conforme avaliado através de imuno-histoquímica e coloração de seção serial, descobriu-se que MCs neoplásicos reagem com um anticorpo contra Mcl-1 em todos os pacientes com SM examinados ($n = 25$). Expressão de Mcl-1 em mastócitos humanos neoplásicos é analisada através de detecção imunohistoquímica de triptase e Mcl-1 em MCs neoplásicos em um paciente com SM indolente (ISM). Seções de medula óssea adjacentes são incubadas com anticorpos contra triptase ou Mcl-1. Imuno-histoquímica é realizada conforme descrito.

10 Detecção imunocitoquímica de expressão de Mcl-1 é ainda analisada em células HMC-1.2 que exibem a mutação *KIT* D816V. Imunocitoquímica é realizada usando um anticorpo policlonal anti-Mcl-1. Pré-incubação do anticorpo com um peptídeo de bloqueio específico resultou em uma coloração negativa. Os mesmos resultados de coloração são obtidos com células HMC-1.1 carecendo de KIT 816V. Analise Northern blot de células HMC-1.1 e células HMC-1.2 usando uma sonda de cDNA mcl-1-20 específica e um controle de carregamento de β -actina. Análise por RT-PCR de expressão de mRNA de mcl-1 em células K562, células HMC-1.1, células HMC-1.2, bem como mastócitos humanos neoplásicos purificados (pureza > 98%) é obtida de um paciente com sarcoma de mastócitos (MCS) (Nº1) e dois pacientes (Nº2 e Nº3) com leucemia de mastócitos (MCL). A 25 reação de PCR é controlada omitindo a etapa de RT (- RT).

30 **RESULTADOS:** Coexpressão de triptase e de Mcl-1 é observada em MC neoplásico de BM em formato de fusão em um paciente com ISM. Descobriu-se que virtualmente todos os MCs neoplásicos nesses infiltrados se coram positivos para Mcl-1. Também, não existem diferenças na expressão de Mcl-1 (com relação ao percentual de MCs corados nos infiltrados ou a intensidade de coloração) em MCs através de imuno-histoquímica quando de comparação de pacientes em várias categorias de SM. Em particular,

descobriu-se que Mcl-1 é expressa em MCs neoplásicos em pacientes com ISM e SSM, bem como em malignidades de alto grau, tais como ASM e MCL. Também descobriu-se que a linhagem de célula de leucemia humana MCL-derivada HMC-1 (HMC-1.1 e HMC-1.2) expressa proteína Mcl-1, conforme determinado através de imunocitoquímica. A reatividade do anticorpo anti-Mcl-1 com células HMC-1.1 após pré-incubação com meio de controle ou um peptídeo de bloqueio Mcl-1-específico é realizada e o mesmo resultado é obtido com células HMC-1.2.

Detecção de mRNA de mcl-1 em mastócitos neoplásicos

Em uma próxima etapa é examinada a expressão de mRNA de mcl-1 em células HMC-1 e MC neoplásicos primários. Conforme avaliado através de Northern blotting, descobriu-se que células HMC-1.1 e células HMC-1.2 expressam mRNA de mcl-1. A expressão de mRNA de mcl-1 em células HMC-1 é confirmada através de análise por RT-PCR. Além disso, nos foram capazes de demonstrar a expressão de mRNA de mcl-1 em MC neoplásico primário altamente purificado em pacientes com MCL ou MCS, através de análise por RT-PCR.

Subregulação de mcl-1 contra-atua a viabilidade de MC neoplásica

MÉTODO: Os efeitos de oligonucleotídeos antissenso de mcl-1 sobre a expressão de proteína de mcl-1 e viabilidade celular em células HMC-1.1 e HMC-1.2 são analisados. Células HMC-1.1 e células HMC-1.2 abrigando *KIT* D816V são transferidas com um oligonucleotídeo antissenso de mcl-1 a 250 nM, um controle misturado ou são deixadas não-transfetadas durante 12 horas antes de serem analisadas. Análise por Western blot de expressão de mcl-1 é realizada usando um anticorpo anti-mcl-1. β-actina serviu como um controle de carregamento. Avaliação de células não-viáveis (azul de tripano-positivas) é expressa como um percentual de todas as células nucleadas (números (%) de células apoptóticas). Os resultados representam a média ± S.D. de 3 experimentos independentes.

Os efeitos dose- e tempo-dependentes de oligonucleotídeos antissenso de mcl-1 sobre mastócitos neoplásicos são analisados via análise por Western blot de expressão de Mcl-1 em células HMC-1.1 e células HMC-

1.2 após exposição a várias concentrações de oligonucleotídeos antissenso de mcl-1 (50-250 nM) ou meio de controle durante 12 horas. β-actina serve como controle de carregamento. Os efeitos tempo-dependentes de oligonucleotídeos antissenso de mcl-1 (250 nM) e um controle misturado (250 nM) sobre a expressão da proteína Mcl-1 em células HMC-1.1 e células HMC-1.2 são observados. A expressão de Mcl-1 é determinada através de Western blotting com β-actina servindo como um controle de carregamento. Os efeitos tempo-dependentes de oligonucleotídeos antissenso de mcl-1 (250 nM) e do controle misturado (250 nM) sobre a viabilidade celular, isto é, o percentual de células HCM-1.1 e células HCM-1.2 apoptóticas são obtidos. Os resultados representam a média ± S.D. de 3 experimentos independentes.

RESULTADOS: Para investigar o papel de Mcl-1 como uma molécula de sobrevivência e alvo potencial em SM, nocaute de Mcl-1 é feito em células HMC-1.1, bem como em células HMC-1.2 através da abordagem de oligonucleotídeo antissenso (ASO). Conforme determinado através de Western blotting, a transfecção de ambas as linhagens de linhagem com ASO de mcl-1 (250 nM) eliminou virtualmente a expressão de proteína Mcl-1 quando comparado com o controle misturado ou células não-transfetadas. Conforme esperado, a transfecção com ASO de mcl-1 leva a um aumento substancial nas células azul de tripano-positivas (o controle é cerca de 1-5%; o controle misturado é de cerca de 5-8%; ASO é cerca de 35-50%) e a um aumento similarmente substancial no percentual de células apoptóticas em ambos os suclones de HMC-1 testados, isto é, células HCM-1.1 e células HCM-1.2. Descobriu-se que os efeitos do ASO de mcl-1 sobre o crescimento e a sobrevivência de MCs neoplásicos (HCM-1) era dose- e tempo-dependente. Esses dados mostram que objetivação de mcl-1 em MCs neoplásicos através de uma abordagem de ASO está associada à perda de viabilidade celular e indução de apoptose.

Efeitos de siRNA de mcl-1 sobre mastócitos neoplásicos

MÉTODO: Os efeitos de siRNA de mcl-1 são analisados em mastócitos neoplásicos sobre a expressão de proteína Mcl-1 e viabilidade celular em células HMC-1.1 e células HMC-1.2. As células são deixadas

não-transfetadas (Controle) ou são transfetadas com siRNA mcl-1-específico (mcl-1-siRNA; 200 nM) ou um siRNA luciferase-específico (controle) (luc-siRNA; 200 nM) conforme descrito aqui. Expressão de proteína Mcl-1 é determinada através de Western blotting usando um anticorpo polyclonal anti-Mcl-1. Carregamento igual é confirmado através de hibridização de β-actina. A viabilidade celular é analisada registrando o percentual (%) de células apoptóticas. Os resultados representam a média ± S.D. de 3 experimentos independentes em cada conjunto de experimentos.

RESULTADOS: Em uma próxima etapa, é aplicado um siRNA mcl-1-específico para demonstrar adicionalmente o papel de mcl-1 como uma molécula sobrevivência-relacionada e alvo potencial em MCs neoplásicos. Nesses experimentos, descobriu-se que siRNA de mcl-1 subregula a expressão da proteína Mcl-1 em células HMC-1.1 e células HMC-1.2. Descobriu-se que a subregulação siRNA-induzida de Mcl-1 está associada a um aumento em células apoptóticas em células HMC-1.1, bem como em células HMC-1.2. Esses dados proporcionam evidência adicional de que mcl-1 é um fator de sobrevivência essencial em MCs neoplásicos.

Efeitos de agentes antineoplásicos e fármacos objetivados sobre a expressão de Mcl-1 em mastócitos neoplásicos

MÉTODO: Os efeitos de PKC412, nilotinib (isto é, 4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-N-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)fenil] benzamida), imatinib (isto é, GLEEVEC ou GLEEVEC) ou 2CdA sobre a expressão da proteína Mcl-1 e sobre a viabilidade celular em células HMC-1.1 carecendo de KIT DS816V e em células HMC-1.2 exibindo kit/D816V é observada. Expressão de proteína Mcl-1 é determinada através de Western blotting usando um anticorpo polyclonal anti-Mcl-1. Carregamento igual é confirmado através de hibridização de β-actina. A viabilidade celular é analisada registrando o percentual (%) de células apoptóticas. Resultados documentando os efeitos de fármaco sobre a viabilidade celular representam a média ± S.D. de 3 experimentos independentes.

RESULTADOS: Em uma etapa seguinte, são explorados os efeitos de vários fármacos objetivados sobre a expressão de Mcl-1 em células

HMC-1. Nesses experimentos, foi descoberto que PKC412 (0,3-10 μ M), 4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-N-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)fenil] benzamida (10-300 nM) e imatinib (30-300 nM), mas não 2CdA (até 1.000 ng/ml), sub-regulam a expressão da proteína Mcl-1 em células HMC-1.1 carecendo de *KIT* D816V. Quando de aplicação dos mesmos fármacos (nas mesmas concentrações) sobre células HMC-1.2 exibindo *KIT* D816V, foi descoberto que PKC412 (1-10 μ M) e 2CdA (10-100 ng/ml) diminuem a expressão de Mcl-1 comparado com o controle, enquanto que nenhum efeito significativo é observado com 4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-N-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)fenil] benzamida ou imatinib sobre a faixa de dose testada. Em ambas as linhagens de célula, descobriu-se que a diminuição fármaco-induzida na expressão da proteína Mcl-1 está acompanhada por um aumento em células apoptóticas.

ASO de Mcl-1 coopera com PKC412, 4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-N-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)fenil] benzamida (nilotinib) e imatinib na produção de inibição de crescimento em MCs neoplásicos.

Baseado nos efeitos rigorosos de fármacos objetivados e do ASO mcl-1-específico, estão interessados em aprender se combinações de fármacos e ASO resultariam em efeitos antiproliferativos (ou de indução de apoptose) sinergísticos sobre células HCM-1.1 e células HCM-1.2. Em uma primeira etapa, os valores de IC₅₀ são determinados para cada único fármaco em experimentos de captação de ³H-timidina e experimentos que determinam o número de células apoptóticas após exposição a fármacos. Os respectivos resultados (valores de IC₅₀) são resumidos na Tabela 1. Com relação aos fármacos objetivados, os dados são grandemente consistentes com as observações anteriores. As concentrações de fármacos objetivados requeridas para bloquear a proliferação são usualmente menores comparado com aquelas requeridas para indução de apoptose. Em concordância com dados anteriores, descobriu-se que PKC412 e 2CdA e, até um grau menor, 4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-N-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)fenil] benzamida contra-atuam o crescimento celular em célu-

las HMC-1.2 em concentrações farmacologicamente relevantes. Em contraste, em células HMC-1.1, descobriu-se que PKC412, 4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-N-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)fenil] benzamida e imatinib reduzem o crescimento celular e induzem à apoptose, enquanto que nenhum efeito significativo é observado com 2CdA. Descobriu-se que ASO de mcl-1 inibe a proliferação e induz à apoptose do subclone HMC-1.1 e HMC-1.2, com valores de IC₅₀ ligeiramente maiores observados em células HMC-1.2.

Tabela 1

- 10 Efeitos de vários fármacos objetivados sobre a captação de ³H-timidina (IC₅₀) e indução de apoptose (EC50) em células HCM-1.1 e HCM-1.2

Cápatação de ³ H-timidina apoptose (EC50)* (IC50)*				
composto	HMC-1.1	HMC-1.2	HMC-1.1	HMC-1.2
mcl-1 ASO	40-80 nM	60-100 nM	250 nM	>250 nM
PKC412	50-250 nM	50-250 nM	0,5-3 μM	0,5-3 μM
nilotinib**	3-10 nM	1-3 μM	30-80 nM	>10 μM
Imatinib	10-30 nM	>3 μM	50-150 nM	>10 μM
2CdA	0,1-0,3 μg/mL	5-20 ng/mL	>1 μg/mL	>1 ng/mL

*A captação de ³H-timidina é analisada após 24 horas de incubação com fármacos ou transfecção com ASO e o percentual de células apoptóticas determinado sobre preparações de Citospina após as células terem sido incubadas com fármacos durante 24 horas. Para avaliação de apoptose, as células são examinadas 12 horas após transfecção com ASO porque, após 24 horas, o número de células apoptóticas é >50% em todos os casos.

15 ** nilotinib é 4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-N-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)fenil] benzamida

Os efeitos de oligonucleotídeos antissenso de mcl-1 e fármacos objetivados sobre o crescimento e viabilidade de mastócitos neoplásicos carecendo (HMC-1.1) ou exibindo (HMC-1.2) KITD816V são analisados.

MÉTODO: Efeitos de várias concentrações de PKC412, 4-metil-

3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-N-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)fenil] benzamida (nilotinib), STI571 (imatinib) ou 2CdA sobre a captação de 3 H-timidina por células HMC-1.1 transfectadas com um controle misturado ou com oligonucleotídeos antissenso de mcl-1, 50 nM são obtidos.

- 5 Os resultados são expressos como percentual do controle (= controle misturado) sem fármaco objetivado e representam a média \pm SD de 3 experimentos independentes. Os efeitos de oligonucleotídeo antissenso de mcl-1 ou controle misturado (cada 100 nM) aplicados com PKC412, nilotinib, STI571 (imatinib) ou 2CdA ou sem o respectivo fármaco sobre a viabilidade celular,
10 isto é, percentual (%) de células apoptóticas, são analisados. Os resultados representam a média \pm SD de 3 experimentos independentes. Usando o software CalcuSyn, análises de relações dose-efeito de PKC412, nilotinib, STI571 (imatinib) ou 2CdA e apoptose antissenso de mcl-1-induzida em células HMC-1.1 são calculados de acordo com o método de efeito médio de
15 Chou e Talalay. Um índice de combinação (CI) de menos de 1 indica sinergismo.

Os efeitos de várias concentrações de PKC412, nilotinib, STI571 (imatinib) ou 2CdA sobre captação de 3 H-timidina por células HMC-1.2 transfectadas com um controle misturado ou oligonucleotídeos antissenso de mcl-
20 1 (80 nM) são analisados. Os resultados são expressos como percentual de controle, isto é, controle misturado sem fármaco objetivado e representam a média \pm SD de 3 experimentos independentes. Os efeitos de oligonucleotídeos antissenso de mcl-1 ou controle misturado (cada 100 nM) aplicados com PKC412, nilotinib, STI571 (imatinib) ou 2CdA ou sem o respectivo fár-
25 maco sobre a viabilidade celular, isto é, o percentual (%) de células apoptóticas é analisado. Os resultados representam a média \pm SD de 3 experimentos independentes. Usando o software CalcuSyn, análises de relações dose-dependente de PKC412, nilotinib, STI571 (imatinib) ou 2CdA e apoptose mcl-1 antissenso-induzida em células HMC-1.2 são calculados de acordo
30 com o método de efeito médio de Chou e Talalay. Um índice combinado (CI) menor do que 1 indica sinergismo.

RESULTADOS: Quando de comparação de respostas fármaco-

- induzidas de células HCM-1 transfectadas com controle misturado, diferenças substanciais são encontradas. Na verdade, na maioria dos casos, des-
 5 cobriu-se que transfecção com ASO de mcl-1 sensibiliza células HMC-1 contra inibidores de TK, bem como contra 2CdA. De modo interessante, em cé-
 lulas HMC-1.1, descobriu-se que a maioria das combinações é de natureza sinergística. Em contraste, em células HMC-1.2, efeitos sinergísticos são
 10 observados apenas com combinações de ASO e PKC412 e ASO e 2CdA, mas não com ASO e 4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-N-[5-(4-
 metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil) fenil] benzamida ou ASO e imatinib.
 15 Em geral, esses dados mostram que Mcl-1 pode ser empregado como um novo alvo de fármaco em MCs neoplásicos e que um ASO mcl-1-específico é capaz de sensibilizar células HCM-1 contra 2CdA e novos inibidores de TK.

Discussão

15 Mcl-1 é um membro bem caracterizado da família Bcl-2 que foi recentemente implicado na patogênese de vários neoplasmas mieloides. Mastocitose sistêmica (SM) é um neoplasma mielóide caracterizado por crescimento anormal e acúmulo de MCs em órgãos viscerais. É fornecida evidência de que MCs neoplásicos em pacientes com SM, bem como a linhagem de célula de leucemia de mastócitos humana HCM-1 expressa Mcl-
 20 1 de uma maneira constitutiva. Além disso, os dados mostram que Mcl-1 é uma molécula de sobrevivência crítica em MCs neoplásicos e que objetiva-
 ção de Mcl-1 por ASO ou siRNA está associada a uma sobrevivência diminuída de MCs neoplásicos e a uma resposta aumentada a inibidores de qui-
 25 nase de tirosina KIT, incluindo PKC412 ou 4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-
 pirimidinil]amino]-N-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)fenil] benzamida.

30 MCs neoplásicos e normais são células de vida extremamente longa comparado com a maioria das outras linhagens mieloides, incluindo basófilos, mas os mecanismos e fatores de sobrevivência responsáveis por sua sobrevivência a longo prazo permanecem grandemente desconhecidos. Embora membros da família Bcl-2 tenham sido implicados como fatores de

sobrevida essenciais em células granulomonocíticas, pouco se sabe a respeito da expressão e papel dessas moléculas em MCs. Até o momento, foi relatado que MCs neoplásicos, bem como células HCM-1, expressam Bcl-2. Além disso, MCs neoplásicos em SM são descritos como mostrando Bcl-xL. Nesse estudo, são capazes de demonstrar a expressão de Mcl-1 em MCs neoplásicos a nível de mRNA e proteína, bem como através de análises funcionais empregando siRNA e ASO específicos. Assim, baseado nos dados, Mcl-1 deve ser considerada como um fator de sobrevida crucial expresso em MCs neoplásicos.

O curso clínico em SM é variável e oscila de assintomático, com baixa capacidade proliferativa de MC e expectativa de vida normal a casos altamente agressivos com rápida proliferação de MCs neoplásicos e uma curta sobrevida. Portanto, estavam interessados em aprender se os níveis de Mcl-1 variavam entre os grupos de pacientes com SM. Contudo, nenhuma diferença evidente na expressão de Mcl-1 em MC é detectada quando de comparação de malignidades em MC de baixo e alto grau. Essa observação pode ser explicada pelo fato de que a expressão de Mcl-1 está relacionada à sobrevida de MC, ao invés de sua capacidade proliferativa. Na verdade, mesmo em SM indolente, MCs exibem sobrevida extremamente longa. Por outro lado, Cervero et al reportaram uma expressão aumentada de Bcl-2 em MCs de BM era pacientes com MCL, comparado com ISM usando uma técnica de citometria de fluxo altamente sensível. Portanto, não podem excluir que MCs em MCL expressam níveis ligeiramente maiores de Mcl-1 comparado com MCs normais ou MCs em ISM, uma vez que a técnica aplicada no estudo é menos sensível comparado com citometria de fluxo.

Pouco se sabe sobre a regulação de expressão de Mcl-1 em células mieloides neoplásicas. Em leucemia mielóide crônica (CML), descobriu-se que a oncoproteína doença-relacionada BCR/ABL promove expressão de Mcl-1. Em SM, a variante de KIT com mutação D816V serve como uma oncoproteína doença-relacionada de uma maneira similar quando comparado com BCR/ABL em CML. Para explorar se essa oncoproteína poderia

estar envolvida na regulação de expressão de Mcl-1 em MCs neoplásicos, foram utilizados inibidores de atividade de TK de KIT. Nesses experimentos, descobriu-se que PKC412, 4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-N-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)fenil] benzamida e imatinib subre-

5 regulam a expressão de Mcl-1 em HMC-1.1 (carecendo de *KIT* D816V, mas expressando *KIT* G560V), enquanto que células HMC-1.2 expressando *KIT* D816V, apenas PKC412 e, até um grau menor, 4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-N-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)fenil] benzamida, diminuíram a expressão da proteína Mcl-1. Uma vez que PKC412 ini-

10 be potenteamente a atividade de TK de *KIT* D816V e uma vez que essa mutação confere resistência contra o imatinib, essas observações puderam ser construídas para favorecer a hipótese de que *KIT* D816V contribui para a expressão anormal de Mcl-1 em MCs neoplásicos. Por outro lado, os dados também sugerem que expressão de Mcl-1 é detectável e *KIT*-dependente

15 em células HMC-1 carecendo de *KIT* D816V, uma vez que inibidores de TK KIT subregularam a expressão de Mcl-1 em células HMC-1.1. Essa observação é de interesse particular, uma vez que MCs em malignidades de alto grau (ASM ou MCL) frequentemente carecem de *KIT* D816V ou têm subclones KIT D816V-negativos que podem ser selecionados durante terapia TK-

20 objetivada para causar reincidente.

Mcl-1 é uma molécula de sobrevivência bem estabelecida que contra-atua a apoptose em células mieloides. Para fornecer evidência do significado funcional de expressão de Mcl-1 em MCs neoplásicos, células HMC-1 são transfectadas com ASO mcl-1-específico ou siRNA mcl-1-

25 específico. Em ambos os subclones de HCM-1, o nocaute induzido por ASO e siRNA específicos da proteína Mcl-1 é demonstrável através de Western blotting e é acompanhado por um aumento significativo em células apoptóticas. Além disso, a proliferação de células HCM-1 diminuiu após transfeção com ASO de Mcl-1 comparado com células transfectadas com um controle misturado. Esses dados proporcionam evidência sólida de que Mcl-1 é um fator de sobrevivência importante em células HCM-1.

Em seguida, são comparados os efeitos de inibição de prolifera-

ção e indução de apoptose de ASO de mcl-1 e vários fármacos objetivados, incluindo 2CdA e novos inibidores de TK KIT. Um aspecto interessante nesses experimentos é que a proliferação, medida através de captação de ³H-timidina, é suprimida em menores concentrações de inibidores de TK quando comparado com a indução de apoptose. Essa discrepância pode ter implicações significativas quando de comparação dos efeitos de vários fármacos inibitórios e pode ser melhor explicada pelo fato de que a captação de ³H-timidina é um parâmetro mais sensível de crescimento e pode ser afetada antes que sinais de apoptose ocorram.

ASM e MCL são malignidades de MCs de alto grau com um grave prognóstico e uma curta sobrevida. Nesses pacientes, uma série de diferentes fatores pode contribuir para o crescimento e a sobrevida normal de MCs e é difícil identificar fármacos que contra-atacam o crescimento de células neoplásicas nesses pacientes. Contudo, durante os últimos anos, uma série de novos conceitos de tratamento e fármacos objetivados foram identificados os quais superam a resistência a fármaco em neoplasmas de MC de alto grau. Um desses fármacos é PKC412, um novo inibidor de TK que contra-ataca a atividade de TK de mutantes de Flt3, KIT do tipo silvestre, bem como KIT D816V. Correspondentemente, descobriu-se que PKC412 contra-ataca o crescimento e expressão de Mcl-1 em células HMC-1.2 expressando KIT D816V no presente estudo. Com relação à inibição de crescimento, esses dados confirmam observações anteriores por inventores e por outros. Contudo, mesmo PKC412 como um único fármaco não pode ser capaz de induzir a remissões completas duráveis em pacientes com ASM ou MCL.

Uma abordagem mais atraente em neoplasmas mieloides resistentes a fármaco, TK-acionados é combinar fármacos objetivados uns com os outros ou com fármacos convencionais. No caso de ASM ou MCL, assim, pode ser razoável considerar combinações de fármacos empregando PKC412, outros inibidores de TK e outros fármacos objetivados. Os resultados do nosso estudo mostram que ASO de mcl-1 e PKC412, bem como ASO de mcl-1 e 4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil] amino]-N-[5-(4-metil-

1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)fenil] benzamida, cooperam um com o outro na produção de inibição de crescimento em células HMC-1.1 e células HMC-1.2. Além disso, efeitos cooperativos também são observados quando de aplicação de imatinib e ASO de mcl-1 em células HMC-1.1. Uma observação interessante é que os efeitos cooperativos de fármacos entre ASO de mcl-1 e PKC412 são sinergísticos em ambos os subclones de HMC-1, enquanto que as interações entre ASO de mcl-1 e 4-metil-3-[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-N-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)fenil] benzamida são sinergísticos apenas em células HMC-1.1, mas não em células HCM-1.2. Essas diferenças são melhor explicadas pelos efeitos antiproliferativos menos pronunciados do imatinib e 4-metil-3-[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-N-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)fenil] benzamida comparado com os efeitos de PKC412 sobre células HMC-1.2, as quais mostram *KIT D816V*.

2CdA é um fármaco que foi recentemente introduzido como um novo agente citorreduutivo eficaz para o tratamento de SM avançada. No presente estudo, descobriu-se que 2CdA inibe o crescimento e a expressão de Mcl-1 em células HMC-1.2 muito mais potenteamente comparado com células HMC-1.1, as quais podem ser de grande importância clínica, uma vez que a maioria dos pacientes com SM, incluindo aqueles com ASM e MCL, mostram essa mutação KIT. Assim, 2CdA é o primeiro fármaco descrito para atuar melhor em MCs expressando *KIT D816V*, bem como MCs carecendo desse mutante *KIT*. Contudo, a despeito desses efeitos, 2CdA não produz efeitos antiproliferativos sinergísticos com ASO de mcl-1 nos dois subclones de HMC-1 analisados.

Uma série de experimentos clínicos em Fase I/II têm tentado empregar fármacos do tipo ASO. Contudo, a despeito dos primeiros resultados encorajadores, algumas reservas foram feitas no passado com referência à possibilidade de aplicar tais fármacos em pacientes com câncer. No que se refere a mcl-1 e SM, outros estudos pré-clínicos e clínicos serão requeridos para definir se conceitos de tratamento de objetivação de mcl-1 podem ser desenvolvidos o bastante para entrar em experimentos clínicos

em ASM e MCL.

Em resumo, os dados mostram que MCs neoplásicos expressam Mcl-1 e que objetivação de Mcl-1 está associada à sobrevida diminuída e responsividade aumentada contra inibidores de TK, tal como PKC412. Esses 5 dados sugerem que Mcl-1 é um novo alvo interessante em MCs neoplásicos que pode ajudar a superar a resistência contra inibidores de TK.

Sequência de Listagem

<110> Novartis AG
 Valent, Peter
 <120> Combinações Compreendendo Estaurosporinas
 <130> 50270A
 <160> 10
 <170> PatenIn versão 3,3
 <210> 1
 <211> 4020
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 caccggccgt tag gactggccgc cctaaaaaccg tgataaaagga gctgctcgcc acttctca ct 60
 tcggcttccct tccaggtaagg agtcggggtc ttccccagtt ttcttcagcca ggccggcgacg 120
 gcgactggca atgtttggcc tcaaaaagaaa cgccggtaatc ggactcaacc tctactgtgg 180
 gggggccggc ttggggggccg gcagcggcgg cgccaccgc ccgggg&gggc gacttttggc 240
 tacggagaag gaggcctcgg cccggcgaga gataggggga ggggaggccg gcgccgtat 300
 tggcggaaagc gcccggcgcaa gccccccgtc caccctcacg ccagactccc ggagggtcgc 360
 gggccgcgcg cccattggcg cccgggtccc cgacgtcacc gcgaccccccgg cggggctgt 420
 ttcttcgcg cccacccgcg ggcgcggcgcg gctttagggag atggaaagccc cggccgtga 480
 ccccatcatg tcgccccgaag aggagcttggc cgggtacgag ccggagccgc tcgggaagcg 540
 gccggctgtc ctgcccgtgc tggagtttgt cggggaatct ggttaataaca ccagtacggc 600
 cgggtcacta ccctcgacgc cgccgccagc agaggaggag gaggacgagt tgtaccggca 660
 gtcgctggag attatcttc ggtaccttcg ggagcaggcc accggcgcca aggacacaaa 720
 gccaatgggc aggtctgggg ccaccagcag gaaggcgtcg gagacttac gacgggttgg 780
 ggatggcgtg cagcgcaacc acgagacggc cttccaaaggc atgcttcggc aactggacat 840
 caaaaaacgaa gacgatgtga aatcggtgtc tcgagtgtatg atccatgttt tcagcgacgg 900
 cgtaacaaac tggggcagga ttgtgactct cattttttt ggtgcctttt tggctaaaca 960
 cttgaagacc ataaaaccaag aaagctgtat cgaaccatta gcagaaaagta tcacagacgt 1020
 tctcgtaagg acaaaaacggg actggctagt taaacaaaaga ggctgggatg ggtttgtgg 1080
 gttcttcat gtagaggacc tagaagggtgg catcaggaat gtgtctgtgg cttttgcagg 1140
 tggctgtgg a tagggagctg gtttggcata tctataaga tagccttact gtaagtgc当地
 tagtgactt ttaaccaacc accaccacca ccaaaaaccag tttatgcagt tggactccaa 1260
 gctgttaactt cctagagtg caccctagca acctagccag aaaagcaagt ggcagagaga 1320
 ttatggctaa caagaataaa tacatggaa pagtgcgtccc cattgattga agagtcaactg 1380
 tctgaaaagaa gcaaaatgtca gtttcagcaa caaacaaact ttgtttggaa agctatggag 1440
 gaggactttt agattttagtg aagatggtag ggtggaaaga cttaaattcc ttgttgagaa 1500

caggaaaagtg	gccagtagcc	aggcaagtca	tagaattgat	tacccgccga	attcattaat	1560
ttactgttgt	gttaagagaa	gcactaagaa	tgccagtgac	ctgttaaaaa	gttacaagta	1620
atagaactat	gactgttgc	ctcagttactg	tacaaggaa	gctttccctc	tctctaattt	1680
gctttccctc	agatacttctt	agaaagtcca	agtgttcagg	acttttatac	ctgttatact	1740
ttggcttggt	ttccatgatt	cttactttat	tagcctagtt	tatcaccaat	aatacttgac	1800
ggaaggctca	gtatattgtt	atgaatatgg	atatcctcaa	ttcttaagac	agcttgtaaa	1860
tgtatattgtt	aaaattgttat	atatttttac	agaaagtcta	tttcttggaa	acgaaggaag	1920
tatcgaattt	acattagttt	ttttcatacc	cttttgaact	ttgcaacttc	cgtaatttgg	1980
aacctgtttc	ttacagcttt	tctatgctaa	actttgttct	gttcagttct	agagtgtata	2040
cagaacgaat	tgtatgttaa	ctgtatgcag	actgggttga	gtggAACAAA	tctgataact	2100
atgcagggtt	aaattttctt	atctgatttt	ggtaagtatt	ccttagatag	ttttttcttt	2160
gaaaacctgg	gattgagagg	ttgatgaatg	gaaattcttt	cacttcatta	tatgcaagtt	2220
ttaaataatt	aggcttaagt	ggagttttaa	ggttactgtat	gacttacaaa	taatgggctc	2280
tgattggca	atactcattt	gagttccctc	catttgcacct	aatttactg	gtgaaattta	2340
aagtgaattt	atgggctcat	ctttaaagct	tttactaaaa	gattttcagc	tgaatggAAC	2400
tcattagctg	tgtcatata	aaaagatcac	atcaggtgga	tggagagaca	tttgatccct	2460
tgtttgccta	ataaaattata	aaatgatggc	ttggAAAAGC	aggctagtct	aaccatggtg	2520
ctattattag	gcttgctgt	tacacacaca	ggtcttaccc	tagtatgtca	ataaaagcaaa	2580
tacttacigt	tttgcatttta	ttaatgattt	ccaaaccttg	ttgcaagttt	ttgcattggc	2640
atctttggat	ttcagttttt	atgtttgtt	tatcagactt	aaccttttat	ttccctgtccct	2700
ttccctgaaat	tgctgattgt	tctgtccct	ctacagatat	ttatataaat	tcctacagct	2760
ttccccctgccc	atcccgttac	tctttcttgc	ccttttagat	tttggcactg	tggAAACCCCT	2820
gctggaaacc	tgagtgtaccc	ccccccccca	ccaagagtcc	acagaccttt	catctttcac	2880
gaacttgcac	ctgttagcag	gtggtaatac	catgggtgct	gtgacactaa	cagtcattga	2940
gaggtggag	gaagtccctt	ttccctggac	ttgtatcttt	tcaactattt	ttttatcctg	3000
tctttgggg	caatgtgtca	aaagtccccct	caggaatttt	cagaggaaag	aacattttat	3060
gaggctttct	ctaaagtttc	ctttgtatag	gagttatgttc	actttttttt	acagaaagag	3120
gtgagctgt	ttaaacctca	gagttttaaa	gctactgata	aactgaagaa	agtgtctata	3180
ttggaaactag	ggtcatttga	aagcttcagt	ctcggaaacat	gaccttttagt	ctgtggactc	3240
catttaaaaa	taggtatgaa	taagatgact	aagaatgtaa	tggggaaagaa	ctgcccgtcc	3300
tgcccatctc	agagccataa	ggtcattttt	gcttagagct	tttttaccta	tgtatattatc	3360
gttcttgcac	ataagccgt	tatataatc	atgtatctct	aaggacctaa	aagcactttt	3420
tgtatttttt	aattaatctt	aagatctggt	tacggtaact	aaaaaagcct	gtctgccaAA	3480
tccagtgaa	acaagtgcac	agatgtgaat	ttgttttttag	gggccccact	tcccaattca	3540

ttaggtatga	ctgtggaaat	acagacaagg	atcttagttg	atattttggg	cttggggcag	3600
tgagggctta	ggacacccca	agtggttgg	gaaaggagga	ggggagtgg	gggtttatag	3660
ggggaggagg	aggcaggtgg	tctaagtgc	gactggctac	gtagttcggg	caaatccctc	3720
aaaagggaaa	gggaggattt	gcttagaagg	atggcgctcc	cagtgactac	tttttgactt	3780
ctgtttgtct	tacgcttctc	tcagggaaaa	acatgcagtc	ctctagtgtt	tcatgtacat	3840
tctgtgggg	gtgaacacct	tggttctgg	taaacagctg	tacttttgc	agctgtgcca	3900
ggaagggtta	ggaccaacta	caaattaatg	ttgggttgtca	aatgtgtgt	gtttccctaa	3960
ctttctgttt	ttccctgagaa	aaaaaaataa	atcttttatt	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	4020

<210> 2
<211> 350
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Phe Gly Leu Lys Arg Asn Ala Val Ile Gly Leu Asn Leu Tyr Cys
1 5 10 15

Gly Gly Ala Gly Leu Gly Ala Gly Ser Gly Gly Ala Thr Arg Pro Gly
20 25 30

Gly Arg Leu Leu Ala Thr Glu Lys Glu Ala Ser Ala Arg Arg Glu Ile
35 40 45

Gly Gly Gly Glu Ala Gly Ala Val Ile Gly Gly Ser Ala Gly Ala Ser
50 55 60

Pro Pro Ser Thr Leu Thr Pro Asp Ser Arg Arg Val Ala Arg Pro Pro
65 70 75 80

Pro Ile Gly Ala Glu Val Pro Asp Val Thr Ala Thr Pro Ala Arg Leu
85 90 95

Leu Phe Phe Ala Pro Thr Arg Arg Ala Ala Pro Leu Glu Glu Met Glu
100 105 110

Ala Pro Ala Ala Asp Ala Ile Met Ser Pro Glu Glu Glu Leu Asp Gly
115 120 125

Tyr Glu Pro Glu Pro Leu Gly Lys Arg Pro Ala Val Leu Pro Leu Leu
130 135 140

Glu Leu Val Gly Glu Ser Gly Asn Asn Thr Ser Thr Asp Gly Ser Leu
145 150 155 160

Pro Ser Thr Pro Pro Ala Glu Glu Glu Asp Glu Leu Tyr Arg
165 170 175

Gln Ser Leu Glu Ile Ile Ser Arg Tyr Leu Arg Glu Gln Ala Thr Gly
 180 185 190

Ala Lys Asp Thr Lys Pro Met Gly Arg Ser Gly Ala Thr Ser Arg Lys
 195 200 205

Ala Leu Glu Thr Leu Arg Arg Val Gly Asp Gly Val Gln Arg Asn His
 210 215 220

Glu Thr Ala Phe Gln Gly Met Leu Arg Lys Leu Asp Ile Lys Asn Glu
 225 230 235 240

Asp Asp Val Lys Ser Leu Ser Arg Val Met Ile His Val Phe Ser Asp
 245 250 255

Gly Val Thr Asn Trp Gly Arg Ile Val Thr Leu Ile Ser Phe Gly Ala
 260 265 270

Phe Val Ala Lys His Leu Lys Thr Ile Asn Gln Glu Ser Cys Ile Glu
 275 280 285

Pro Leu Ala Glu Ser Ile Thr Asp Val Leu Val Arg Thr Lys Arg Asp
 290 295 300

Trp Leu Val Lys Gln Arg Gly Trp Asp Gly Phe Val Glu Phe Phe His
 305 310 315 320

Val Glu Asp Leu Glu Gly Gly Ile Arg Asn Val Leu Leu Ala Phe Ala
 325 330 335

Gly Val Ala Gly Val Gly Ala Gly Leu Ala Tyr Leu Ile Arg
 340 345 350

<210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 tgctggagtt ggtcgaaaa

20

<210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 tcgtaaggc tccagcgcc

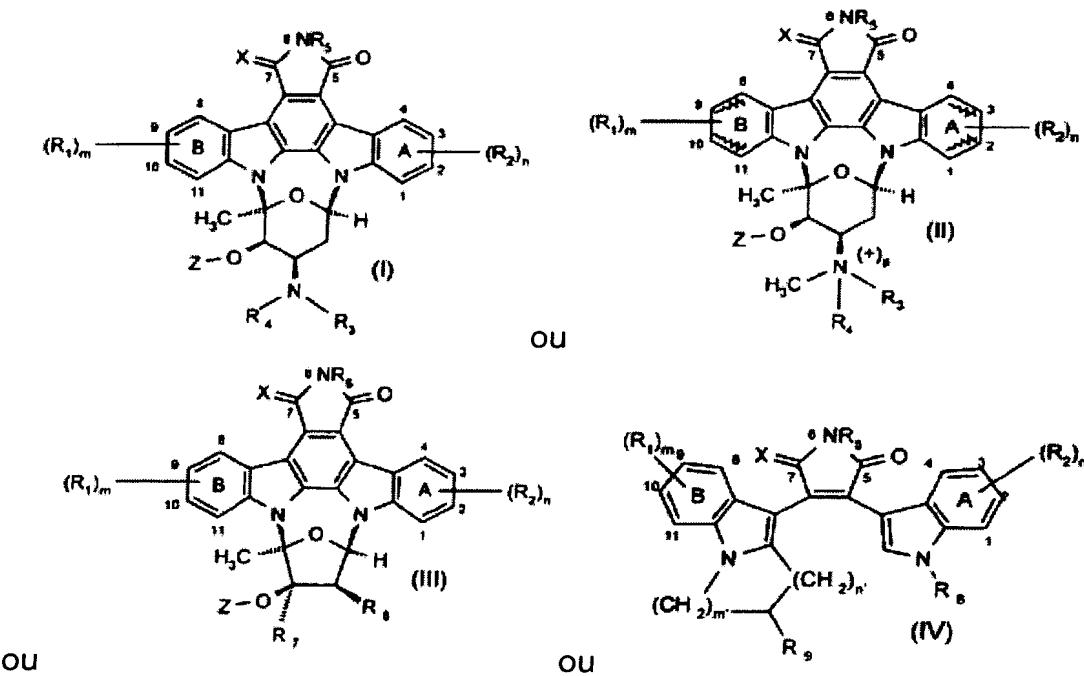
20

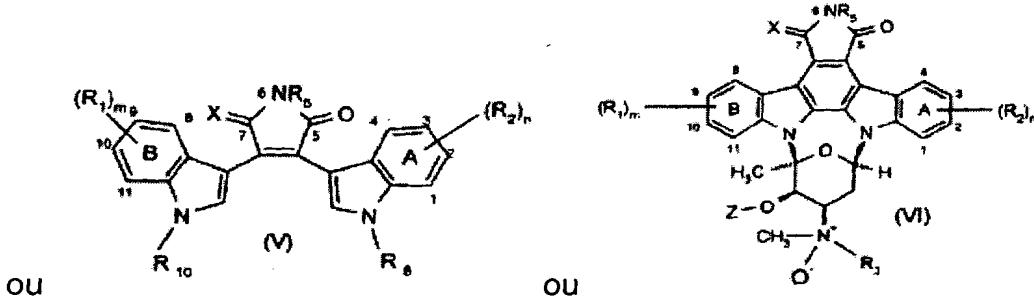
<210> 5
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 5	21
atggatgtat atatcgccgc g	
<210> 6	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 6	33
ctagaagcat ttgcgggtgga cgatggaggg gcc	
<210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 7	20
ttggctttgt gtccttggcg	
<210> 8	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 8	21
aagaaacgcg guauucggac u	
<210> 9	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 9	21
aguccgauua ccgcguuuuu u	
<210> 10	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 10	19
cuuacgcuga guacuuucga	

REIVINDICAÇÕES

1. Método de tratamento de síndromes mielodisplásicas, linfomas e leucemias e tumores sólidos em um mamífero o qual compreende tratamento do mamífero que precisa de tal tratamento simultânea, concorrente, separada ou sequencialmente com quantidades farmaceuticamente eficazes de (a) um inibidor de FLT-3 ou um sal ou pró-fármaco farmaceuticamente aceitável do mesmo e (b) um oligonucleotídeo antissenso de mcl-1 ou um constructo de RNAi mcl-1-específico.
- 5 2. Método de acordo com a reivindicação 1, para o tratamento de leucemia mielóide aguda (AML).
- 10 3. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o inibidor de FLT-3 é um derivado de estaurosponina ou 4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-N-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)fenil] benza-
mida ou imatinib.
- 15 4. Método de acordo com a reivindicação 3, em que o derivado de estaurosponina é selecionado dos compostos de fórmula:





em que:

- R₁ e R₂ são, independentemente um do outro, alquila não-substituída ou substituída, hidrogênio, halogênio, hidróxi, hidróxi eterificado ou esterificado, amino, amino mono- ou dissustituído, ciano, nitro, mercapto, mercapto substituído, carbóxi, carbóxi esterificado, carbamoila, carbamoila N-mono- ou N,N-dissustituída, sulfo, sulfonila substituída, amino-sulfonila ou amino-sulfonila N-mono- ou N,N-dissustituída;
- 5 n e m são, independentemente um do outro, um número de e incluindo 0 a e incluindo 4;

- 10 n' e m' são, independentemente um do outro, um número de e incluindo 1 a e incluindo 4;

- R₃, R₄, R₈ e R₁₀ são, independentemente uns dos outros, hidrogênio, um radical alifático, carbocílico ou carbocíclico-alifático com até 29 átomos de carbono em cada caso, um radical heterocílico ou heterocíclico-alifático com até 20 átomos de carbono em cada caso e, em cada caso, até 9 heteroátomos, uma acila com até 30 átomos de carbono, em que R₄ pode também estar ausente;

ou R₃ é acila com até 30 átomos de carbono e R₄ não é uma acila;

- 20 p é 0 se R₄ está ausente ou é 1 se R₃ e R₄ estiverem ambos presentes e, em cada caso, são um dos radicais antes mencionados;

- R₅ é hidrogênio, um radical alifático, carbocílico ou carbocíclico-alifático com até 29 átomos de carbono em cada caso ou um radical heterocílico ou heterocíclico-alifático com até 20 átomos de carbono em cada caso e, em cada caso, até 9 heteroátomos ou acila com até 30 átomos de carbono;

R₇, R₆ e R₉ são acila ou -(alquil inferior)-acila, alquila não-

substituída ou substituída, hidrogênio, halogênio, hidróxi, hidróxi eterificado ou esterificado, amino, amino mono- ou dissustituído, ciano, nitro, mercapto, mercapto substituído, carbóxi, carbonila, carbonildióxi, carbóxi esterificado, carbamoíla, carbamoíla N-mono- ou N,N-dissustituída, sulfo, sulfonila substituída, amino-sulfonila ou amino-sulfonila N-mono- ou N,N-dissustituída;

X significa 2 átomos de hidrogênio; 1 átomo de hidrogênio e hidróxi; O; ou hidrogênio e alcóxi inferior;

Z significa hidrogênio ou alquila inferior;

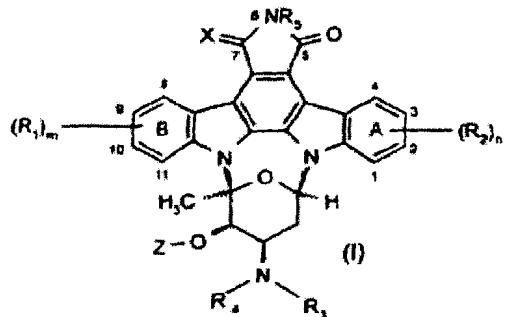
10 e as duas ligações caracterizadas por linhas onduladas estão ausentes no anel A e são substituídas por 4 átomos de hidrogênio e as duas linhas onduladas no anel B, cada uma junto com a respectiva ligação paralela, significa uma ligação dupla;

15 ou as duas ligações caracterizadas por linhas onduladas estão ausentes no anel B e são substituídas por um total de 4 átomos de hidrogênio e as duas linhas onduladas no anel A, cada uma junto com a respectiva ligação paralela, significa uma ligação dupla;

ou ambas as 4 ligações onduladas no anel A e no anel B estão ausentes e são substituídas por um total de 8 átomos de hidrogênio;

20 ou um sal do mesmo, se pelo menos um grupo de formação de sal estiver presente.

5. Método de acordo com a reivindicação 3, em que o derivado de estaurosponina é um derivado de estaurosponina de fórmula I:



em que:

25 m e n são, cada um, 0;

R3 e R4 são, cada um independentemente um do outro, hidro-

gênio, alquila inferior não-substituída ou mono- ou dissustituída, especialmente monossustituída, por radicais selecionados independentemente uns dos outros de carbóxi; carbonila alcóxi-inferior; e ciano; ou

R_4 é hidrogênio ou $-CH_3$ e

5 R_3 é acila da subfórmula $R^o\text{-CO}$, em que R^o é alquila inferior; amino-alquila inferior, em que o grupo amino está presente na forma não- protegida ou é protegido por alcóxi carbonila inferior; tetrahidropiranilóxi- alquila inferior; fenila; imidazolil-alcóxi-fenila inferior; carboxifenila; carbonil- fenila alcóxi-inferior; halogênio-alquil fenila inferior; imidazol-1-ilfenila; pirroli- 10 dino-alquil fenila inferior; piperazino-alquil fenila inferior; (4-alquil piperazino- metil inferior) fenila; morfolino-alquil fenila inferior; piperazinocarbonilfenila; ou (4-alquil piperazino inferior)fenila;

ou é acila da subfórmula $R^o\text{-O-CO}$, em que R^o é alquila inferior;

ou é acila da subfórmula $R^o\text{HN-C(=W)-}$, em que W é oxigênio e

15 R^o tem os seguintes significados: morfolino-alquila inferior, fenila, alcóxi feni- la inferior, carbóxifenila ou alquilcarbonilfenila inferior;
ou R_3 é alquil fenil-sulfonila inferior, tipicamente 4-tolueno- sulfonila;

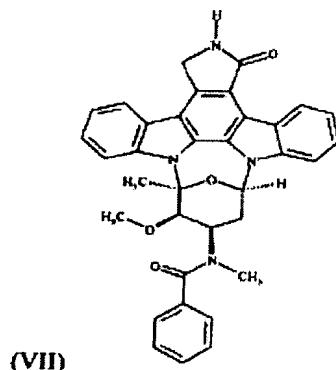
R_5 é hidrogênio ou alquila inferior;

20 X significa 2 átomos de hidrogênio ou O;

Z é metila ou hidrogênio;

ou um sal do mesmo, se pelo menos um grupo de formação de sal estiver presente.

25 6. Método de acordo com a reivindicação 3, em que o derivado de estaurosporina é N-[(9S,10R, 11R,13R)-2,3,10,11,12,13-hexahidro-10- metóxi-9-metil-1-oxo-9,13-epóxi-1H,9H-di-indolo[1,2,3-gh:3',2',1'- 1m]pirrolo[3,4-j][1,7]benzodiazonin-11-il]-N-metilbenzamida da fórmula (VII):

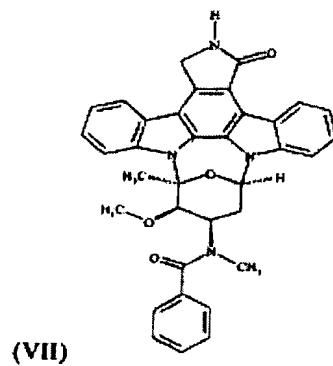


ou um sal do mesmo.

7. Uso de uma combinação de (a) um inibidor de FLT-3 e (b) um oligonucleotídeo antissenso de mcl-1 ou um constructo de RNAi mcl-1-específico para o tratamento de síndromes mielodisplásicas, linfomas e leucemias e tumores sólidos.

8. Uso de acordo com a reivindicação 7, para o tratamento de leucemia mielóide aguda (AML), câncer cólon-retal (CRC) ou câncer de pulmão de células não-pequenas (NSCLC).

9. Uso de acordo com a reivindicação 7, em que o inibidor de
10 FLT-3 é N-[(9S,10R, 11R,13R)-2,3,10,11,12,13-hexahidro-10-metóxi-9-metil-1-oxo-9,13-epóxi-1H,9H-di-indolo[1,2,3-gh:3',2',1'-1m]pirrolo[3,4-j][1,7]benzodiazonin-11-il]-N-metilbenzamida da fórmula (VII):

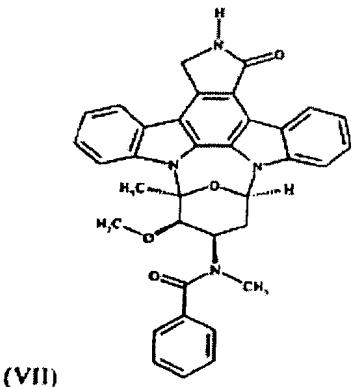


ou um sal do mesmo e um oligonucleotídeo antissenso de mcl-1 ou um constructo de RNAi mcl-1-específico.

15 10. Uso de uma combinação de (a) um inibidor de FLT-3 e (b) um oligonucleotídeo antissenso de mcl-1 ou um constructo de RNAi mcl-1-específico para a preparação de um medicamento para o tratamento de síndromes mielodisplásicas, linfomas e leucemias e tumores sólidos.

11. Uso de acordo com a reivindicação 10, para o tratamento de leucemia mielóide aguda (AML), câncer cólon-retal (CRC) ou câncer de pulmão de células não-pequenas (NSCLC).

12. Uso de acordo com a reivindicação 10, em que o inibidor de
 5 FLT-3 é N-[(9S,10R, 11R,13R)-2,3,10,11,12,13-hexahidro-10-metóxi-9-metil-
 1-oxo-9,13-epóxi-1H,9H-di-indolo[1,2,3-gh:3',2',1'-1m]pirrolo[3,4-
 j][1,7]benzodiazonin-11-il]-N-metilbenzamida da fórmula (VII):

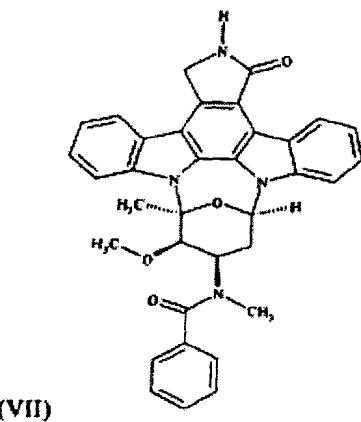


ou um sal do mesmo e um oligonucleotídeo antissenso de mcl-1 ou um constructo de RNAi mcl-1-específico.

- 10 13. Composição farmacêutica compreendendo (a) um inibidor de FLT-3 e (b) um oligonucleotídeo antissenso de mcl-1 ou um constructo de RNAi mcl-1-específico para o tratamento de síndromes mielodisplásicas, linfomas e leucemias e tumores sólidos.

- 15 14. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 13, para o tratamento de leucemia mielóide aguda (AML), câncer cólon-retal (CRC) ou câncer de pulmão de células não-pequenas (NSCLC).

- 15 15. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 13, em que o inibidor de FLT-3 é N-[(9S,10R, 11R,13R)-2,3,10,11,12,13-hexahidro-10-metóxi-9-metil-1-oxo-9,13-epóxi-1H,9H-di-indolo[1,2,3-gh:3',2',1'-1m]pirrolo[3,4-j][1,7]benzodiazonin-11-il]-N-metilbenzamida da fórmula (VII):



ou um sal do mesmo e um oligonucleotídeo antissenso de mcl-1 ou um constructo de RNAi mcl-1-específico.

16. Ácido nucleico isolado compreendendo uma sequência de nucleotídeo selecionada de SEQ ID N°:3, SEQ ID N°:4, SEQ ID N°:7, SEQ ID N°:8 e SEQ ID N°:9 ou sua sequência de fita complementar.
17. Vetor compreendendo o ácido nucleico isolado como definido na reivindicação 16.
18. Célula hospedeira compreendendo o ácido nucleico isolado como definido na reivindicação 16.
19. RNA de hairpina curto (shRNA) compreendendo uma sequência selecionada de SEQ ID N°:7, SEQ ID N°:8 e SEQ ID N°:9 ou sua sequência de fita complementar.
20. Oligonucleotídeo antissenso compreendendo uma sequência selecionada de SEQ ID N°:3 e SEQ ID N°:4 ou sua sequência de fita complementar.

RESUMO

Patente de Invenção: "**COMBINAÇÕES COMPREENDENDO ESTAUROSPORINAS**".

A presente invenção refere-se a um método de tratamento de síndromes mielodisplásicas, linfomas e leucemias e também tumores sólidos com uma combinação farmacêutica de um inibidor de quinase FLT-3 e a um oligonucleotídeo antissenso ou a um constructo de RNAi mcl-1-específico. Ele também se refere ao uso de uma combinação farmacêutica de um inibidor de deacetilase de histona e um inibidor de quinase FLT-3 para o tratamento das doenças ou malignidades mencionadas acima e ao uso de tal composição farmacêutica para a fabricação de um medicamento para o tratamento dessas doenças ou malignidades.